

**1-Benzazepinone mit neuartiger, heterozyklischer  $d$ -Anellierung  
als Proteinkinase-Inhibitoren:  
Synthese und biologische Charakterisierung**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Nadine Caroline Tolle  
aus Wolfenbüttel

1. Referent: Professor Dr. Conrad Kunick

2. Referent: Professor Dr. Ingo Ott

eingereicht am: 02.02.2011

mündliche Prüfung (Disputation) am: 25.03.2011

Druckjahr 2011

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Tolle, N., Kunick, C.: Paullones as inhibitors of protein kinases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, angenommen.

## **Tagungsbeiträge**

Tolle, N., Preu, L., Ferandin, Y., Meijer, L., Kunick, C.: Syntheses and CDK/GSK-3 selectivity of 11-methoxy-substituted paullone derivatives. (Poster) Meeting of the European Federation for Medicinal Chemistry, Barcelona, Spain (2009).

Tolle, N., Preu, L., Ferandin, Y., Meijer, L., Kunick, C.: 11-Methoxy-1-azakenpaullone: A new selective inhibitor of Glycogen Synthase Kinase-3. (Poster) DPhG-Jahrestagung, Jena (2009).

Tolle, N., Dunkel, U., Müller, C., Preu, L., Oehninger, L., Rubbiani, R., Meyer, A., Ott, I., Haase, T., Behrends, S., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Kunick, C.: Novel fluorescent protein kinase inhibitors. (Vortrag) DPhG-Jahrestagung, Braunschweig (2010).



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2007 bis Januar 2011 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von

**Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,**

dem ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung und Unterstützung sowie die schöne Zeit in seinem Arbeitskreis danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

**Herrn Professor Dr. Ingo Ott**

für die Übernahme des Koreferats.



---

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Kontext des Themas	1
1.2	Proteinkinasen und deren Entartung	1
1.2.1	Proteinkinasen in der Signaltransduktion	1
1.2.2	Struktur und Aktivität der Proteinkinasen	3
1.2.2.1	Aufbau der Kinasedomäne	3
1.2.2.2	Strukturelle Regulation der enzymatischen Aktivität	5
1.2.3	Einfluss von Proteinkinasen auf Erkrankungen	7
1.3	Intervention der Signalwege von Proteinkinasen	9
1.3.1	Inhibition der Genexpression von Signaltransduktionsproteinen	9
1.3.2	Hemmung der Liganden von Rezeptor-Tyrosinkinasen	10
1.3.3	Inhibition der extrazellulären Domäne von Rezeptor-Tyrosinkinasen	11
1.3.4	Inhibition der katalytischen Kinasedomäne	12
1.3.4.1	Klassifizierung der Inhibitoren	12
1.3.4.2	Kinase-Selektivität von Inhibitoren	13
1.3.4.3	Etablierte Proteinkinase-Inhibitoren	14
1.3.4.4	Paullone als Proteinkinase-Inhibitoren	19
1.4	Zelluläre Umgebung und Darstellung	21
1.4.1	Proteinkinasen als intrazelluläre Zielstrukturen	21
1.4.2	Verfahren zur subzellulären Darstellung	22
1.4.3	Fluorophore	23
1.4.4	Photodynamische Therapie von Tumorerkrankungen	24
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>26</b>
2.1	Problemstellung	26
2.2	Ziel der Arbeit	26
<b>3</b>	<b>Synthesen</b>	<b>30</b>
3.1	Darstellung der Ausgangssubstanzen 1-Benzazepin-2,5-dion <b>24a</b> und Pyrido[3,2- <i>b</i> ]azepin-6,9-dion <b>24b</b>	30
3.1.1	Synthese des 3,4-Dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepin-2,5-dions ( <b>24a</b> )	30
3.1.2	Synthese des 7,8-Dihydro-5 <i>H</i> -pyrido[3,2- <i>b</i> ]azepin-6,9-dions ( <b>24b</b> )	31

3.2	Synthese des 2,3-Diphenyl-4,6-dihydro-5 <i>H</i> -furo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepin-5-ons ( <b>17</b> ) und dessen Analoga	33
3.2.1	Synthese des Halbketals <b>15</b> und Reaktionsoptimierung	33
3.2.2	Reduktion zum 2,3-Diphenyl-4,6-dihydro-5 <i>H</i> -furo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepin-5-on ( <b>17</b> )	37
3.2.3	Umsetzung des 3,4-Dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepin-2,5-dions ( <b>24a</b> ) mit Benzil-Analoga	38
3.3	Darstellung neuer 11-Methoxy-substituierter Indolo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepinone <b>20</b> und entsprechender 1-Azaanaloga <b>21</b>	39
3.3.1	Darstellung der Phenylhydrazine <b>44</b> und <b>46</b>	40
3.3.2	Synthese der 11-Methoxy- und 9-Brom-11-methoxy-substituierten 7,12-Dihydroindolo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepin-6(5 <i>H</i> )-one <b>20</b>	46
3.3.3	Synthese der 11-Methoxy- und 9-Brom-11-methoxy-substituierten 7,12-Dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5- <i>b</i> ]indol-6(5 <i>H</i> )-one <b>21</b>	48
3.4	Fluoreszierende Borkomplexe als <i>d</i> -anellierte 1-Benzazepinone	49
3.4.1	Hintergrund zur Synthese von Borverbindungen	49
3.4.2	Synthese der 4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1 <i>H</i> -1-benzazepin-2,5-dione ( <b>54</b> )	51
3.4.3	Darstellung der Difluoroborkomplexe <b>22</b>	53
3.4.4	Besonderheiten der Analytik der Difluoroborkomplexe <b>22</b>	58
3.4.4.1	NMR-spektroskopische Ergebnisse	58
3.4.4.2	Röntgenkristallstruktur der Difluoroborverbindung <b>22a</b>	62
3.4.4.3	Massenspektroskopische Untersuchungen	65
3.4.4.4	Stabilitätsdaten der Verbindungen <b>22</b>	67
3.4.5	Darstellung der Diphenylborkomplexe <b>23</b>	69
3.4.6	Besonderheiten der Analytik der Diphenylborkomplexe <b>23</b>	72
3.4.6.1	Röntgenkristallstruktur der Diphenylborverbindung <b>23a</b>	72
3.4.6.2	Stabilitätsdaten der Verbindungen <b>23</b>	74
3.4.7	Darstellung von Dialkoxyborkomplexen <b>49</b>	76
3.4.8	Difluoroborkomplexe aus 1-Azapauillon <b>68</b> und 1-Azahydrazon <b>67</b>	77
4	<b>Spektroskopie der Borverbindungen <b>22</b> und <b>23</b></b>	<b>80</b>
4.1	Absorptionsspektroskopie	80
4.1.1	Grundlagen der Absorption	80
4.1.2	Absorptionseigenschaften der Verbindungen <b>22</b> und <b>23</b>	83



---

4.1.3	Absorptionseigenschaften im Vergleich	88
4.2	Lumineszenzspektroskopie	90
4.2.1	Grundlagen der Photolumineszenz	90
4.2.2	Lumineszenzeigenschaften der Verbindungen <b>22</b> und <b>23</b>	93
4.2.3	Emissionseigenschaften im Vergleich	97
4.2.4	Quantenausbeute	98
<b>5</b>	<b>Biologische Aktivität</b>	<b>106</b>
5.1	Verfahren zur Bestimmung der biologischen Aktivität	106
5.1.1	Untersuchungen zur Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität	106
5.1.2	Untersuchungen zur antiproliferativen Aktivität	107
5.2	Biologische Aktivität der Furo[3,2- <i>d</i> ][1]benzazepinone <b>17</b> und <b>18</b> sowie der Halbketal-Derivate <b>15</b> und <b>16</b>	107
5.2.1	Proteinkinase-inhibitorische Eigenschaften der Verbindungen <b>15</b> , <b>16</b> , <b>17</b> und <b>18</b>	107
5.2.2	Docking-Studien mit <b>17</b> in Aurora A, IGF-1R und SRC	110
5.2.3	Spezifische Proteinkinasen – Aurora-Kinasen, IGF-1R und SRC	115
5.2.4	Antiproliferative Aktivität der Verbindungen <b>15</b> und <b>17</b>	117
5.3	Biologische Aktivität der 9-Brom-11-methoxy-substituierten Paullonderivate <b>20a</b> und <b>21a</b>	121
5.3.1	Proteinkinase-inhibitorische Eigenschaften der Verbindungen <b>20a</b> und <b>21a</b>	121
5.3.2	Potentieller Bindungsmodus von <b>21a</b> in der GSK-3 $\beta$	123
5.3.3	Spezifische Proteinkinasen – GSK-3 und CDKs	125
5.3.4	Antiproliferative Aktivität der Verbindungen <b>20a</b> und <b>21a</b>	127
5.4	Biologische Aktivität der Difluoroborkkomplexe <b>22</b>	129
5.4.1	Proteinkinase-inhibitorische Eigenschaften der Verbindungen <b>22</b>	129
5.4.2	Spezifische Proteinkinasen – ALK und VEGF-R	133
5.4.3	Antiproliferative Aktivität der Verbindungen <b>22g</b> und <b>22r</b>	135
5.4.4	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung	137
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>140</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>143</b>
<b>8</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>146</b>

8.1	Allgemeines	146
8.1.1	Geräte und Methoden	146
8.1.2	Bezug der Ausgangsmaterialien	150
8.2	Synthesen und analytische Daten	150
8.3	Spektroskopische Daten	214
8.3.1	Absorptions- und Emissionsspektren	214
8.4	Biologische Daten	225
8.4.1	Assay zur Kinaseinhibition mit 16 Proteinkinasen	225
8.4.2	Assay mit GSK-3 und verwandten Kinasen	231
8.4.3	<i>In vitro</i> -Tumorzelllinien-Screening (NCI)	234
8.4.4	Untersuchungen zur antiproliferativen Aktivität der Paullonderivate <b>20a</b> und <b>21a</b> und der Borkomplexe <b>22g</b> und <b>22r</b>	238
8.4.5	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Verbindungen <b>22g</b> , <b>22r</b> und <b>22u</b> in der HT-29 Zellkultur	239
8.4.6	Durchführung der molekularen Dockingstudien	240
9	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>242</b>

---

**Abkürzungsverzeichnis**

AAV: Allgemeine Arbeitsvorschrift; Abb.: Abbildung; ABL: *Abelson tyrosine kinase*; ACN: Acetonitril; AKT/PKB: *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog, protein kinase B*; ALK: *anaplastic lymphoma kinase*; ArH: aromatisches Proton; ARK5: *AMP-activated protein kinase-related protein kinase 5*; ARMD: *age-related macular degeneration*; ATP: Adenosintriphosphat; AUC: *area under the curve*; AXL: *AXL receptor tyrosine kinase*; BCR: *breakpoint cluster region*; ber.: berechnet; BNCT: *boron neutron capture therapy*; BODIPY: *boron-dipyrromethene*; BRET: *bioluminescence resonance energy transfer*; BSA: *bovine serum albumin*; CDK: *cyclin-dependent kinase*; CHK: *C-terminal SRC kinase-homologous kinase*; CK1: *casein kinase 1*; CKI: *CDK-inhibitory protein*; cKIT: *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*; CLK1: *CDC-like kinase 1*; CML: chronisch-myeloische Leukämie; COMPARZ: *Pazopanib versus sunitinib in the treatment of subjects with locally advanced and/or metastatic renal cell carcinoma*; d: Dublett; DAD: *diode array detector*;  $\delta$ : chemische Verschiebung; DEPT: *distortionless enhancement by polarization transfer*; DIC: *differential interference contrast*; DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium*; DMF: *N,N-Dimethylformamid*; DMFDMA: *N,N-Dimethylformamid-Dimethylacetal*; DMSO: Dimethylsulfoxid; DMSO- $d_6$ : Hexadeuterodimethylsulfoxid; DNA: Desoxyribonukleinsäure; D<sub>2</sub>O: Deuteriumoxid; DTT: Dithiothreitol; DYRK1A: *dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A*; EDTA: *ethylene diamine tetraacetic acid*; EGF(R): *epidermal growth factor (receptor)*; EGTA: *ethylene glycol tetraacetic acid*; EI: Elektronenstoß-Ionisation; ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*; EMEA: *European Medicines Agency*;  $\epsilon$ : molarer Absorptionskoeffizient; ERK: *extracellular signal-regulated kinase-2*;  $\eta$ : Refraktionsindex; EtOH: Ethanol; FAK: *fokal adhesion kinase*; FDA: *U.S. Food and Drug Administration*; FLT: *FMS-like tyrosine kinase*; FRET: *fluorescence resonance energy transfer*; gef.: gefunden; GFP: *green fluorescent protein*; GI<sub>50</sub>: *growth inhibition 50%*; GIST: gastrointestinaler Stromatumor; gk: *gatekeeper*; GSH: Glutathion; GSK-3: *glycogen synthase kinase-3*; GST: Glutathion-S-Transferase; h: Plancksches Wirkungsquantum; HCC: *hepatocellular carcinoma*; HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure; HER/ErbB: *human epidermal growth factor receptor*; HOAc: Essigsäure; HOMO: *highest occupied molecular orbital*; HPLC: *high performance liquid chromatography*; HRMS: *high resolution mass spectroscopy*; HTS: *high throughput screening*; Hz: Hertz;  $I$ : Spinquantenzahl; -/+I: negativer/positiver induktiver Effekt; IC<sub>50</sub>:

*inhibitory concentration 50%*; IGF-(1R): *insulin-like growth factor (receptor 1)*; INTEREST: *Iressa non-small cell lung cancer trial evaluating response and survival against Taxotere*; IR: *Infrarot, insulin receptor*; IRS1: *insulin receptor substrat 1*; ISEL: *Iressa survival evaluation in lung cancer*; IVCLSP: *in vitro cell line screening project*; J: *Kopplungskonstante*; KDR: *kinase insert domain receptor*,  $\lambda_{\max}^{\text{abs/em}}$ : *Wellenlänge des Absorptions-/Emissionsmaximums*; LC<sub>50</sub>: *lethal concentration 50%*; LCK: *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*; LUMO: *lowest unoccupied molecular orbital*; m: *Multiplett*; -/+M: *negativer/positiver mesomerer Effekt*; MALDI IMS: *matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry*; MAPK: *mitogen activated protein kinase*; MCL-1: *myeloid leukemia cell differentiation protein 1*; MEK: *mitogen activated protein kinase kinase*; MET: *met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)*; MG-MID: *mean graph midpoint*; mMDH: *mitochondriale Malatdehydrogenase*; M<sub>r</sub>: *relative Molmasse*; MS: *Massenspektroskopie*; m/z: *Masse/Ladungs-Verhältnis*; NADH: *nicotinamid adenine dinucleotide*; NaOAc: *Natriumacetat*; NCI: *National Cancer Institute*; NEK: *NIMA-related kinase*; NF-κB: *nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B-cells*; NMR: *nuclear magnetic resonance*; NSCLC: *non-small cell lung cancer*; PAK: *p21 activated kinase*; PBS: *phosphate buffered saline*; PDB: *Protein Data Bank*; PDGF(R): *platelet-derived growth factor (receptor)*; PDT: *photodynamic therapy*; PfGSK-3: *Plasmodium falciparum GSK-3*; Φ<sub>F</sub>: *Fluoreszenz-Quantenausbeute*; PHK: *phosphorylase kinase*; PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*; PIM: *proviral integration site for Moloney murine leukemia virus*; PIGF: *placenta growth factor*; PLK: *polo-like kinase*; prim.: *primär*; PRK: *protein kinase C-related kinase*; P-TEFb: *positive transcription activation factor B*; q: *Quartett*; quart.: *quartär*; RAHB: *resonance assisted hydrogen bond*; RAF: *v-raf murine leukemia viral oncogene homolog*; RAS: *rat sarcoma viral oncogene homolog*; RCC: *renal cell carcinoma*; RET: *rearranged during transfection*; (m/ds/si)RNA: *(messenger/double-stranded/small interfering) Ribonukleinsäure*; ROS: *reactive oxygen species*; RT: *Raumtemperatur*; (n)RTK: *(nicht-) Rezeptor-Tyrosinkinase*; s: *Singulett*; Schmp.: *Schmelzpunkt*; sek.: *sekundär*; SDS/PAGE: *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SHC: *src homology 2 domain containing transforming protein*; SRC: *v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*; t: *Triplett*; t<sub>M</sub>: *Totzeit*; t<sub>N</sub>: *Nettoretentionszeit*; Tab.: *Tabelle*; tert.: *tertiär*; TMS: *Tetramethylsilan*; TGI: *total growth inhibition*; THF: *Tetrahydrofuran*; TNF-α: *Tumornekrosefaktor α*; TRK: *tropomyosin-related kinase*; VEGF-(R): *vascular endothelial growth factor (receptor)*; ZNS: *Zentralnervensystem*.

# 1 Einleitung

## 1.1 Kontext des Themas

Im Bereich der Tumorerkrankungen werden überwiegend die operative Entfernung entarteten Gewebes, Strahlen- und Chemotherapie als klinisch etablierte Behandlungsoptionen eingesetzt.<sup>1</sup> Bis in die späten 1990er Jahre wurden hauptsächlich chemotherapeutisch aktive Substanzen entwickelt, die wie Alkylantien (z.B. Cyclophosphamid) oder quervernetzende Platinverbindungen (u.a. Cisplatin) die DNA modifizieren, ihre Verdilung durch Hemmung der Topoisomerasen stören (z.B. Doxorubicin, Topotecan) oder als Antimetabolite die DNA- bzw. RNA-Synthese hemmen (Pyrimidin-Analoga wie Fluorouracil, Folsäure-Analoga wie Methotrexat). Außerdem stellt die Mitoseinhibition durch Beeinflussung des Spindelapparates (Abbauhemmung u.a. durch Paclitaxel) und bei Hormon-abhängigen Tumoren wie Mamma- oder Prostatakarzinomen der Eingriff in hormonelle Signalwege (z.B. Tamoxifen) eine Therapieoption dar.<sup>2-4</sup>

Da jedoch zahlreiche gesunde Zellen ebenfalls kontinuierlich proliferieren, zerstören unspezifische zytotoxische Therapeutika auch gesundes Gewebe und sind dadurch in ihrem Einsatz am Patienten limitiert. Folglich war es das Ziel der Antitumorforschung, Substanzen mit neuartigem Wirkmechanismus zu entwickeln, die eine höhere Effizienz, eine größere Selektivität für Krebszellen und eine stärkere Spezialisierung für einzelne Tumorformen aufweisen.

Die durch Proteinkinasen katalysierte Phosphorylierung von Proteinen beschreibt einen Hauptmechanismus in der Regulierung zellulärer Abläufe. Eine fehlgesteuerte Proteinkinase-Aktivität kann daher in zahlreiche Erkrankungen involviert sein, zu denen unter anderem entzündliche, neurologische und vor allem neoplastische Veränderungen gehören. Derzeit stellen Proteinkinasen die am zweithäufigsten angestrebten Zielstrukturen in der Entwicklung potentieller, neuartiger Therapeutika dar.<sup>2,5-8</sup>

## 1.2 Proteinkinasen und deren Entartung

### 1.2.1 Proteinkinasen in der Signaltransduktion

Die Phosphorylierung von Proteinen reguliert fast alle zellulären Abläufe. Diese reversible, posttranslationale Modifikation löst eine Konformationsänderung der

Proteine aus, die in veränderter Aktivität resultiert oder das Interaktionsvermögen mit anderen Proteinen beeinflusst.<sup>9</sup>

Als Phosphatgruppen-übertragende Enzyme sind Proteinkinasen in der Lage den Transfer des  $\gamma$ -Phosphates von Adenosintri-phosphat (ATP) auf spezifische Substratproteine zu katalysieren. Diese Phosphorylierung der Substrate geschieht vorrangig an den Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin (Ser), Threonin (Thr) oder Tyrosin (Tyr). Nach ihrem bevorzugten Phosphorylierungsmuster werden die Proteinkinasen in Ser/Thr- oder Tyr-Kinasen eingeteilt.

518 Gene des menschlichen Genoms (1.7%) kodieren für Proteinkinasen, die nach ihrer Aminosäuresequenz in zwanzig Familien gegliedert sind. Der größte Anteil der Kinasen (478) ist durch eine große Homologie der katalytischen Kinasedomäne charakterisiert, wohingegen die restlichen 40 Enzyme Kinaseaktivität ohne Sequenzähnlichkeit aufweisen. Nur 90 Proteinkinasen stellen Tyr-Kinasen dar, während der überwiegende Teil Ser/Thr-Spezifität zeigt. Dagegen sind einige Proteinkinasen in der Lage sowohl Threonin- als auch Tyrosinreste zu phosphorylieren.<sup>2,10-12</sup>

Zahlreiche unterschiedliche Zellfunktionen werden durch Proteinkinasen kontrolliert, indem sie Substratproteine phosphorylieren, die in Genexpression, Metabolismus, Zellwachstum und –differenzierung, Membrantransport und Apoptose involviert sind. In einigen Fällen weist das Substrat ebenfalls Kinaseeigenschaften auf, so dass ein Signal kaskadenartig weitergeleitet wird, bis schließlich sogenannte Effektorkinasen Substrate phosphorylieren, die die adäquate Zellantwort auslösen.<sup>10</sup>

Tyrosinkinasen werden abhängig von ihrer zellulären Lokalisation in Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) und nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (n-RTKs) unterteilt.<sup>10,13</sup> Bei RTKs handelt es sich um transmembranäre Glykoproteine, die durch Bindung eines spezifischen Liganden an die extrazelluläre Rezeptordomäne oligomerisieren. Dadurch tritt Transphosphorylierung zwischen den zytoplasmatischen Kinasedomänen auf und eine Konformationsänderung unterbindet eine auto-inhibitorische Interaktion mit dem juxtamembranären Bereich.<sup>14</sup> Die resultierende Aktivierung der Tyrosinkinase löst den Ablauf einer intrazellulären Signalkaskade aus. Dagegen liegen n-RTKs frei im Zytosol vor und werden durch Bindung von hemmenden Protein- bzw. Lipidstrukturen oder intramolekulare Inhibition inaktiviert. Sie sind Komponenten von Signalwegen, die RTKs oder anderen Zelloberflächenrezeptoren nachgeschaltet sind.<sup>9,13</sup>

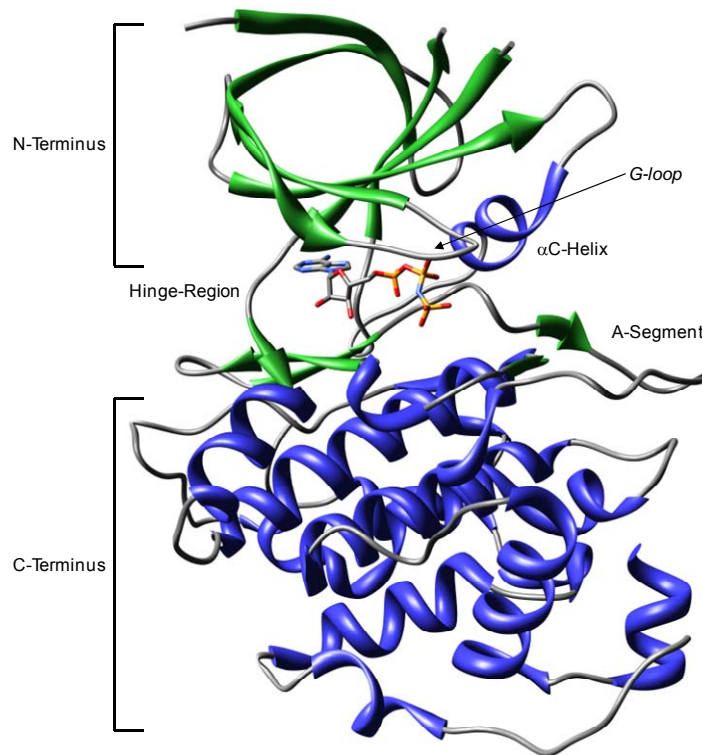
Die zytoplasmatischen Ser/Thr-Kinasen sind vorrangig für die Zellhomöostase verantwortlich und funktionieren meist als Effektorkinasen von Signalkaskaden.<sup>9</sup>

Auf Grund ihrer physiologisch wichtigen Mediatorposition unterstehen die Kinasen einer engmaschigen Regulation. Ihre Aktivität wird durch übergeordnete Kinasen, den Zugang zu Cofaktoren und Liganden sowie die teilweise benötigte Interaktion mit regulatorischen oder aktivierenden Proteinen beeinflusst sowie durch hydrolysierende Phosphatasen antagonisiert.<sup>10</sup>

## **1.2.2 Struktur und Aktivität der Proteinkinasen**

### **1.2.2.1 Aufbau der Kinasedomäne**

Die meisten Proteinkinasen zeigen einen gleichartigen Aufbau aus einer katalytischen Domäne, die für Substratbindung und -phosphorylierung zuständig ist und einer regulatorischen Domäne, welche die Kinaseaktivität beeinflusst. Die ca. 300 Aminosäuren umfassende Kinasedomäne ist strukturell in zwei spezifische Bereiche gegliedert (Abb. 1-1). Der längere, C-terminale Teil weist überwiegend eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur auf, während der N-Terminus aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern mit integrierter  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ C-Helix) gebildet wird. Eine kurze Aminosäuresequenz, die Hinge-Region, verbindet diese zwei Bereiche flexibel miteinander, so dass eine Tasche ausgeformt wird, in der das Cosubstrat ATP sowie das zu phosphorylierende Substrat gebunden und zueinander ausgerichtet werden. Durch die Flexibilität ist eine Anpassung der Bindetasche an die gebundenen Moleküle ohne Zerstörung der Sekundärstruktur der Proteinkinase möglich.<sup>13</sup> Auf Grund des gemeinsamen Cosubstrates ATP weist der katalytisch-aktive Bereich der Kinasen eine große Homologie der Aminosäuresequenz auf.<sup>5</sup>



**Abbildung 1-1:** Katalytische Domäne der Proteinkinase GSK-3 $\beta$  mit nicht-hydrolysierbarem ATP-Analogon (PDB ID: 1pyx)<sup>15</sup>; Darstellung mit Chimera<sup>16</sup>

Im strukturell vorderen Bereich dieser katalytischen Tasche wird ATP gebunden und zur optimalen Übertragung des  $\gamma$ -Phosphates ausgerichtet. Der dahinter liegende hydrophobe Bereich ohne ATP-Kontakt weist eine Kinase-spezifische Varianz in Form und Größe auf. Eine Kontrolle des Zugangs zum hinteren Bereich ergibt sich durch ein konserviertes Lysin der  $\beta_3$ -Faltblattstruktur und dem Aminosäurerest des *gatekeepers* (gk), der den Zugang durch eine geringe Größe (Threonin, Alanin) ermöglicht oder durch raumfüllendes Volumen (Phenylalanin, Leucin, Methionin) erschwert.<sup>12,17</sup>

Die Einbettung des ATP in seine Bindetasche wird vorrangig durch drei Strukturelemente reguliert, die Glycin-reiche Schleife (*G-loop*) im N-Terminus, die  $\alpha$ C-Helix und die Hinge-Region.<sup>2</sup>

Drei Wasserstoffbrücken binden ATP über den Adeninrest an das Rückgrat der Aminosäuren eine bzw. drei Positionen nach dem *gatekeeper* (gk+1/gk+3) in der Hinge-Region. Zusätzlich wird die Position des aromatischen Ringes in dieser Adenintasche durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Der Riboserest interagiert über Wasserstoffbrücken mit Aminosäureresten am Anfang des C-Terminus.



In einer zur Übertragung des  $\gamma$ -Phosphates optimalen Position werden die Phosphatreste unterhalb des stark flexiblen *G-loop* eingebettet. Über zwei divalente Metallionen, die durch den Aspartatrest (Asp) des DFG-Motivs und einen Asparaginrest (Asn) der katalytischen Schleife (*catalytic loop*) koordiniert werden, wird die Triphosphatgruppe ausgerichtet. Das hochkonservierte DFG-Motiv, bestehend aus Aspartat (D), Phenylalanin (F) und Glycin (G), befindet sich am N-terminalen Ende des Aktivierungssegmentes (*A-segment*). Eine zusätzliche Stabilisierung erfährt der Triphosphatrest durch das konservierte Lysin, welches im aktiven Zustand der Kinase durch eine Salzbrücke mit einem zentralen Glutamatrest der  $\alpha$ C-Helix positioniert wird.<sup>17</sup>

In die Bindung des Substrates ist ebenfalls das Aktivierungssegment involviert. Die aktive Konformation dieser Schleife erzeugt die optimale Ausrichtung der Substrat- und Phosphat-bindenden Aminosäuren und den Zugang zur spezifischen, strukturell flachen Substrat-Bindungsstelle. Ein Aspartatrest des *catalytic loop* ist zusätzlich für die Orientierung der Substrat-Hydroxylgruppe und möglicherweise für die Übertragung des  $\gamma$ -Phosphates verantwortlich.<sup>10</sup>

Räumlich vor der Ribosetasche befindet sich ein hydrophiler, dem Lösungsmittel zugänglicher Bereich, der als Zugang zur katalytischen Tasche gilt.<sup>12</sup>

Die hydrophoben Regionen im Hintergrund der Kinasedomäne weisen im Gegensatz zum ATP-bindenden Bereich eine stärkere Strukturvarianz zwischen den einzelnen Kinasen sowie eine größere konformatorische Variabilität auf. Sie können in mehrere Taschen unterteilt werden, von denen der Bereich, der direkt durch den *gatekeeper* abgetrennt hinter der Adenintasche liegt, die größte Bedeutung besitzt. Er wird als Spezifitätstasche bezeichnet, da bei kleinen *gatekeeper*-Resten Wechselwirkungen mit niedrigmolekularen Kinaseinhibitoren in diesem Bereich zu einer erhöhten Inhibitor-Selektivität führen. Die Struktur und der Zugang zu einer benachbarten hydrophoben Tasche werden durch Konformationsänderungen des DFG-Motivs reguliert, die ebenso Einfluss auf die Ausbildung weiterer hydrophober Bereiche haben.<sup>12,17</sup>

### 1.2.2.2 Strukturelle Regulation der enzymatischen Aktivität

Die enzymatische Aktivität der Proteinkinasen wird durch unterschiedliche Kontrollmechanismen reguliert. Einzelne Kinasen bestehen nur aus der isolierten katalytischen Domäne, in den meisten Fällen interagieren Proteinkinasen jedoch mit Aktivitäts-beeinflussenden Strukturen. Diese Regulatoren können wie die SH3- und SH2-Untereinheiten der SRC-Kinase oder die juxtamembranäre Region der RTKs kovalent an die

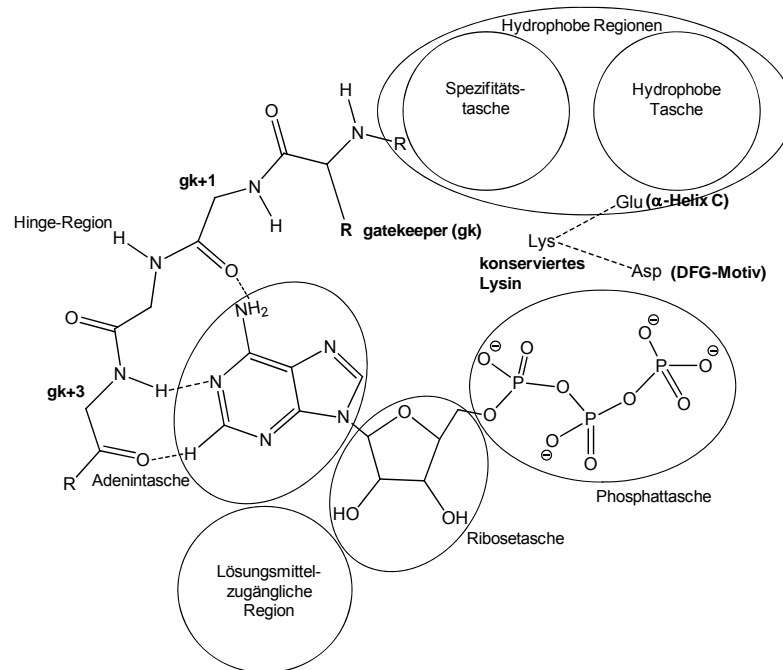
katalytische Domäne gebunden sein oder mit dieser assoziieren wie die Cycline mit den CDKs. Durch die beschriebenen Interaktionen und zusätzliche post-translationale Modifikationen wie die Phosphorylierung durch übergeordnete Kinasen werden Konformationsänderungen der Kinasen ausgelöst, die die katalytische Aktivität regulieren.<sup>2,10</sup>

Bezüglich dieser aktivitätsbeeinflussenden, strukturellen Veränderungen stellen das A-Segment im C-terminalen Teil sowie die  $\alpha$ C-Helix des N-Terminus' Schlüsselpositionen dar.

Das A-Segment setzt sich zusammen aus dem DFG-Motiv, dem *activation-loop* (*A-loop*) und dem *P + 1-loop* sowie weiteren Strukturen. Dabei ist der Ser-, Thr- oder Tyr-Reste aufweisende *A-loop* von besonderer Bedeutung, da er häufig erst nach Phosphorylierung durch übergeordnete Kinasen das katalytische Zentrum freigibt und den Zugang zur Substratbindestelle ermöglicht. Einige Kinasen sind jedoch unabhängig von einer solchen posttranslationalen Modifikation und weisen andere Mechanismen für die Lokalisierung ihres A-Segmentes auf.<sup>10,13,17-18</sup>

Grundsätzlich kann eine Kinase im aktiven oder inaktiven Zustand vorliegen. Im aktiven Zustand zeigt die Kinase eine offene Konformation des A-Segmentes und erfordert gleichzeitig eine DFG-in-Orientierung des hochkonservierten DFG-Motivs. Dadurch wird die Seitenkette des Aspartats (D) in die ATP-Bindetasche hineinorientiert und kann in dieser Position ein Magnesiumkation chelatisieren, das die Ausrichtung des  $\gamma$ -Phosphates für den Transfer auf das Substrat stabilisiert. Der aromatische Ring des Phenylalanins (F) ragt in dieser räumlichen Anordnung in die hydrophobe Tasche hinein und reguliert durch Wechselwirkungen mit der  $\alpha$ C-Helix deren Konformation.

In der Folge ist die Ausbildung einer Ionenpaarbindung zwischen einem Glutamatrest der  $\alpha$ C-Helix und dem konservierten Lysin vereinfacht. Letzteres wird dadurch in einer Position gehalten, die zum einen die Ausrichtung der nicht-übertragenen Phosphatreste des ATPs, zum anderen mit Hilfe einer Salzbrücke die Seitenkette des DFG-Aspartats (D) stabilisiert (Abb. 1-2).



**Abbildung 1-2:** Schematische Darstellung der katalytischen Tasche von Proteinkinasen (modifiziert nach Vulpetti<sup>12</sup> und Ghose<sup>18</sup>)

Inaktive Proteinkinasen liegen meist in einer Konformation vor, in der die erforderliche Orientierung der katalytisch-aktiven Reste ausbleibt oder die Bindung des ATP oder des Substrates verhindert ist. Beispielsweise kann durch die Positionierung des A-Segments im inaktiven Zustand der *A-loop* die Substratbindestelle besetzen.

Während zur Erzielung einer aktiven Kinase die DFG-in-Orientierung unabdingbar ist, kann dieses Motiv im inaktiven Zustand verschiedene Anordnungen einnehmen: DFG-in, DFG-out oder DFG-out-like. In der DFG-out-Stellung ragt der aromatische Rest des Phenylalanins (F) in die ATP-Bindetasche hinein, während die Seitenkette des Aspartats (D) im hinteren Bereich liegt. Dabei ist der DFG-*backbone* in Richtung der ATP-Bindetasche verschoben. Eine DFG-out-like-Konformation ähnelt der DFG-out-Orientierung, weist aber eine weniger starke Verschiebung des DFG-*backbones* in die ATP-Bindetasche auf.<sup>17</sup>

### 1.2.3 Einfluss von Proteinkinasen auf Erkrankungen

Proteinkinasen sind umfassend in die stark vernetzten und komplexen zellulären Signalwege involviert und werden engmaschig durch unterschiedliche Mechanismen überwacht. Verschiedene Ereignisse können eine Fehlregulation der Kinasen auslösen, die eine Störung zellulärer Phosphorylierungsabläufe zur Folge hat.

Einerseits besteht die Möglichkeit der Mutation von Kinasegenen. Punktmutationen oder Deletionen können zum Verlust normaler, autoregulierender Strukturen der Proteinkinase führen sowie Unempfindlichkeit und Unabhängigkeit gegenüber externen Einflüssen erzeugen. Durch die Translokation ganzer Kinasegene kann eine verstärkte Kinaseexpression durch Einfluss benachbarter, regulatorischer Genabschnitte auftreten oder anormale Fusionsproteine mit übermäßiger Kinaseaktivität erzeugen.

Andererseits kann die Erhöhung des Expressionslevels sowohl von Proteinkinasen als auch der Liganden von RTKs oder die Verringerung der negativen Regulatoren für eine übermäßige Kinaseaktivität verantwortlich sein.<sup>9,19</sup>

Da Proteinkinasen einen umfassenden Einfluss auf sämtliche Zellvorgänge zeigen, sind sie durch Fehlregulation in die Ätiologie und Pathogenese zahlreicher Erkrankungen involviert. Durch die Regulation von Zellwachstum, -differenzierung und -proliferation führen übermäßig aktive onkogene Kinasen zu unkontrolliertem Wachstum, Neoplasien sowie Metastasen und schließlich zur Krebsentstehung. Bestimmte Kinasemutationen können mit spezifischen Tumorarten in Verbindung gebracht werden. Beispielsweise erzeugt die V599E-Mutation der B-Raf-Kinase eine Verstärkung von Zellproliferation und -überleben, die die Entwicklung von Melanomen, Schilddrüsen- und Kolorektaltumoren beeinflusst.<sup>20</sup> Des Weiteren exprimiert das durch reziproke Translokation langer Genabschnitte der Chromosomen 9 und 22 entstandene Philadelphia-Chromosom das Fusionsprotein BCR-ABL, das als konstitutiv aktive Tyrosinkinase für die Entstehung der chronisch myeloischen Leukämie verantwortlich ist.<sup>11,21</sup>

Jedoch weisen auch nicht-onkogene und meist genetisch unveränderte Proteinkinasen Tumorrelevanz auf. Sie sind in Signalwegen den onkogenen Kinasen nachgeschaltet und beeinflussen u.a. die Zellproliferation wie die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) oder die Aurora-Kinasen. Außerdem können Kinasen durch Expression in Tumorzellen oder in umgebenden Geweben das Tumorstadium unterstützen und die Invasivität verstärken. So ist z.B. die neurotrophe Rezeptor-Tyrosinkinase TRK-B in der Lage, die als Anoikis bezeichnete Apoptose nach Verlust von Zelladhäsionen zu verhindern und die Metastasierung zu fördern.<sup>22</sup> Ebenso können der vaskuläre endotheliale (VEGF-R) oder der Blutplättchen-assoziierte Wachstumsfaktorrezeptor (PDGFR) auf Tumor-umgebenden Endothelzellen die Sprossung und das Wachstum von Blutgefäßen erzeugen, die der Tumor oberhalb einer Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> zur Nährstoffversorgung benötigt.<sup>23</sup>

Fehlgesteuerte Proteinkinasen sind nicht nur bei Tumorerkrankungen relevant. Sie spielen ebenso eine Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen, neurologischen Krankheiten wie z.B. Morbus Alzheimer und entzündlichen Reaktionen wie rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose.<sup>7</sup> Außerdem werden zahlreiche weitere immunologische und metabolische Erkrankungen (Immundefizienz, Diabetes) sowie Infektionskrankheiten durch Proteinkinasen beeinflusst.<sup>5,8</sup>

### 1.3 Intervention der Signalwege von Proteinkinasen

Zur Beeinflussung der durch abnorme Proteinkinaseaktivität verursachten Zellvorgänge stehen verschiedene Interventionsmöglichkeiten zur Verfügung. Bereits auf der Transkriptionsebene kann die Expression involvierter Signalproteine unterbunden werden. Die meisten in der klinischen Entwicklung befindlichen oder bereits etablierten Inhibitoren sind jedoch direkt gegen die fehlgesteuerten Kinasen bzw. deren Liganden gerichtet.

#### 1.3.1 Inhibition der Genexpression von Signaltransduktionsproteinen

Die RNA-Interferenz beschreibt einen Mechanismus, bei dem die Anwesenheit einer Doppelstrang-RNA (dsRNA) die Expression bestimmter Gene mit homologer Sequenz unterdrückt. Kurze RNA-Stücke aus ca. 21 Nucleotiden, die als *small interfering* RNA (siRNA) bezeichnet werden, werden in einem *RNA-induced silencing complex* (RISC) in Einzelstrang-RNA gespalten und unterstützen dort den Abbau komplementärer mRNA. Diese steht für die Translation zu den entsprechenden Proteinen nicht zur Verfügung.<sup>24</sup> Gerichtet gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) wurde Bevasiranib (OPKO Health) entwickelt. Als erste siRNA erreichte Bevasiranib die Phase III der klinischen Studie gegen altersbedingte Makuladegeneration (ARMD), die allerdings Anfang 2009 wegen unwahrscheinlichen Erreichens des primären Endpunktes abgebrochen wurde. Weitere siRNA-Therapeutika wie der VEGF-R1-Inhibitor Sirna-027 (Allergan) befinden sich zurzeit in unterschiedlichen Stufen der klinischen Entwicklung.<sup>25-26</sup>

Eine weitere Möglichkeit der spezifischen zellulären Expressionshemmung einzelner Gene findet sich im Einsatz von *antisense*-Oligonucleotiden. Als Wirkmechanismus dieser kurzkettigen Einzelstrang-DNAs wird die Bindung an komplementäre mRNAs und deren daraus resultierende Translationshemmung diskutiert. Zahlreiche *antisense*-

Oligonucleotide werden in klinischen Studien hinsichtlich ihrer expressions-verhindernden Eigenschaft gegenüber onkogenen Proteinen und Signalmolekülen untersucht. Einziges zugelassenes *antisense*-Oligonucleotid ist Fomiviren (Vitravene<sup>®</sup>, ISIS/Novartis), das gegen die Boten-mRNA des Zytomegalie-Virus' gerichtet ist.<sup>27</sup>

### 1.3.2 Hemmung der Liganden von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die intrazelluläre Kinasedomäne transmembranärer RTKs wird durch Bindung spezifischer Liganden an ihre extrazelluläre Rezeptordomäne aktiviert. Überexprimierte Liganden können in ihrer Affinität gegenüber dem Rezeptor durch therapeutische monoklonale Antikörper, Rezeptor-Fusionsproteine oder Aptamere zielgerichtet gehemmt werden.

In der Entwicklung monoklonaler Antikörper wird zur Verhinderung einer eigenen Immunogenität und zur Erzielung einer effektiven Immunantwort eine möglichst starke Humanisierung angestrebt. Mit Hilfe rekombinant veränderter DNA können monoklonale Antikörper mit humanem Fc-Teil generiert werden. Dabei kann ein gänzlich muriner Fab-Teil vorliegen (chimärer Antikörper) oder nur der hypervariable Teil aus Maus-Protein bestehen (humanisierter Antikörper). Außerdem können durch transgene Mäuse oder die Technik des Phagen-Displays vollständig humane Antikörper mit Spezifität für bestimmte Antigene produziert werden.<sup>28</sup>

Seit Anfang 2005 ist der humanisierte Antikörper Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>, Genentech/Roche) in Kombination mit einem intravenösen Chemotherapeutikum zur Erstlinientherapie des metastasierenden Kolorektalkarzinoms in Europa zugelassen. Er bindet gezielt an den VEGF und verhindert dessen Bindung an den VEGF-Rezeptor auf vaskulären Endothelzellen, so dass Effekte wie die Angiogenese unterbunden werden. Inzwischen wurde die Zulassung auf zahlreiche weitere Tumorerkrankungen erweitert. Ranibizumab (Lucentis<sup>®</sup>, Genentech/Novartis), ein nur aus dem Fab-Fragment bestehender Teil eines Antikörpers, bindet ebenfalls den VEGF und ist seit 2007 zur Behandlung der ARMD zugelassen.<sup>8,28-29</sup>

Eine weitere Möglichkeit, Liganden von RTKs zu binden, stellen Fusionsproteine aus Rezeptor- und Antikörperfragmenten, die sogenannten *traps*, dar. Sie bestehen aus löslichen Rezeptorfragmenten, welche die extrazelluläre Domäne der RTKs imitieren und zur Stabilitätserhöhung mit dem Fc-Teil eines Antikörpers fusioniert sind. Die hochaffine Rezeptordomäne bindet spezifisch die Liganden und verhindert deren Wechselwirkung mit den RTKs.

Als VEGF-*trap* befindet sich Aflibercept (Regeneron/Sanofi-Aventis) zurzeit in klinischen Untersuchungen bezüglich unterschiedlicher Tumorerkrankungen.<sup>8,30</sup>

Aptamere sind kurzkettige DNA- oder RNA-Oligonucleotide, die durch spezifische Bindung an ein ausgewähltes, immobilisiertes Zielprotein aus einer Substanzbibliothek isoliert wurden. Auf Grund ihrer Größe stellen sie Zwischenstrukturen zwischen niedrigmolekularen, traditionellen Arzneistoffen und den makromolekularen biogenen Therapeutika wie den Antikörpern dar. Das Aptamer Pegaptanib (Macugen®, OSI/Pfizer) bindet an den VEGF. Dieses zur Stabilitätsverbesserung und Eliminationsverminderung pegylierte Oligonucleotid wurde 2006 als spezifischer VEGF-Inhibitor zur Therapie der ARMD zugelassen. Zwar wurde es als Therapeutikum der Wahl in der Behandlung der ARMD vom effizienteren Antikörperfragment Ranibizumab verdrängt, es werden jedoch Studien hinsichtlich weiterer Erkrankungen durchgeführt.<sup>31-32</sup>

### 1.3.3 Inhibition der extrazellulären Domäne von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Neben der Bindung der Liganden können monoklonale Antikörper auch gegen antigene Strukturen der extrazellulären Domäne von Rezeptor-Tyrosinkinasen auf Tumorzellen und Tumor-assoziierten Gefäßzellen gerichtet sein.

Der membranständige EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor*) wird in zahlreichen Tumoren wie in Kolorektalkarzinomen oder Prostatatumoren überexprimiert. 2004 wurde der chimäre Antikörper Cetuximab (Erbix®, ImClone) zur Behandlung kolorektaler Krebserkrankungen zugelassen. Die Antikörperbindung an den EGF-Rezeptor verhindert einerseits physikalisch eine Wechselwirkung mit dem Liganden. Andererseits wird sterisch die Konformationsänderung für die aktivierende Dimerisierung der intrazellulären Domäne der Rezeptor-Tyrosinkinase unterbunden.

Der humanisierte Antikörper Panitumumab (Vectibix®, Amgen) wurde 2007 für die gleiche Indikation eingeführt und interagiert ebenfalls über die beschriebenen Mechanismen. Allerdings weist Panitumumab eine höhere Affinität gegenüber dem EGFR und eine geringere Immunogenität auf.<sup>28-29</sup>

Zur Aktivitätshemmung des EGFR-verwandten Rezeptors HER-2 (ErbB2), der in ca. 25% aller Mammakarzinome überexprimiert ist, erhielt im Jahr 2000 der humanisierte Antikörper Trastuzumab (Herceptin®, Genentech) die Zulassung. Der HER-2-Rezeptor bindet keine extrazellulären Liganden, sondern agiert als Dimerisierungspartner und

aktiviert so unter anderem den EGFR. Diese Assoziation wird durch Trastuzumab unterbunden.<sup>5,28-29</sup>

### 1.3.4 Inhibition der katalytischen Kinasedomäne

#### 1.3.4.1 Klassifizierung der Inhibitoren

Niedrigmolekulare Inhibitoren, die die enzymatische Aktivität durch Interaktion mit der katalytischen Domäne von Proteinkinasen hemmen, können nach ihrem Bindungsmodus, der Bindungsstelle und der inhibierten Konformation der Kinase eingeteilt werden. Eine generelle Einteilung nach der Reversibilität der Hemmung sowie einer Bindung im stark konservierten Bereich der ATP-Bindetasche oder an davon entfernte, allosterische Regionen der Kinase wird durchgeführt.

Inhibitoren im Bereich der ATP-Bindetasche können einerseits die Kinase in der aktiven Konformation hemmen (Typ I-Inhibitoren). Sie imitieren häufig durch aromatische, heterozyklische Strukturen die Adeninstruktur des ATP und weisen Wasserstoffbrücken zur Hinge-Region auf. Vorteilhaft wirkt sich die Typ I-Inhibition bei Erkrankungen aus, die auf dem Vorliegen übermäßig oder konstitutiv aktiver Kinasen basieren. Außerdem zeigt die für die enzymatische Funktion spezifische Tertiärstruktur und somit festgelegte Aminosäuresequenz der ATP-Bindetasche eine äußerst geringe Toleranz gegenüber Mutationen, so dass eine Resistenzentstehung gegenüber dem Typ I-Inhibitor vermindert ist. Allerdings stehen diese Inhibitoren mit einer hohen intrazellulären ATP-Konzentration (1-2 mM) in Konkurrenz und durch die starke Strukturhomologie der ATP-Bindetasche unter den Kinasen muss eine gleichzeitige Inhibition mehrerer Proteinkinasen in Betracht gezogen werden. Zur Erhöhung der Selektivität und Effizienz werden Typ I-Inhibitoren daher mit Strukturelementen ausgestattet, die Wechselwirkungen mit Kinase-spezifischen Bereichen wie den hydrophoben Regionen oder einzelnen, selektiven Aminosäuren in der Hinge-Region oder dem *G-loop* eingehen.

Andererseits können Substanzen im Bereich der ATP-Bindestelle als Inhibitoren vom Typ II die inaktive Konformation der Kinase stabilisieren. Sie verhindern den Zugang von ATP und Substrat zu den spezifischen Bindestellen und verlangsamen eine Umorientierung zur aktiven Struktur. Von Vorteil sind die größeren Unterschiede zwischen den einzelnen Kinasen in der inaktiven Konformation, die für spezifische Bindungen genutzt werden können. Außerdem eröffnet die DFG-out-Anordnung den Zugang zu



einer verdeckten hydrophoben Tasche, deren Aminosäuren selektive Angriffspunkte für Wechselwirkungen mit Inhibitoren darstellen. Die Affinität der inaktiven Kinase gegenüber ATP kann zusätzlich verringert sein, wodurch eine höhere Effizienz des Inhibitors erzeugt wird. Allerdings ist die Resistenzwahrscheinlichkeit erhöht, da Mutationen häufiger in Bereichen auftreten, die nicht für die Phosphatkatalyse zuständig sind.<sup>2</sup>

Inhibitoren können außerdem in allosterischen Bereichen der Kinasen binden, die für die Regulation der katalytischen Aktivität verantwortlich sind. So kann die Aktivierung der Kinase durch regulatorische Untereinheiten verhindert oder die Bindung inhibitorischer Proteinstrukturen imitiert werden. Der regulierende Einfluss dieser allosterischen Bereiche sowie ihre hohe Kinasespezifität macht sie zu erfolgsversprechenden Zielstrukturen für eine selektive Kinaseinhibition. Meist wird durch die Bindung der physiologischen Regulatoren nur eine Erhöhung der Kinaseaktivität erzielt, während eine basale, katalytische Fähigkeit auch ohne diese Interaktionen besteht. Bei Erzeugung einer übermäßigen Kinaseaktivität durch diese Regulatoren, sind allosterische Inhibitoren daher in der Lage, die Übersteigerung ohne einen unbedingten Effekt auf die basale Aktivität zu verringern.<sup>2,5,8</sup>

#### **1.3.4.2 Kinase-Selektivität von Inhibitoren**

Basierend auf der Bestimmung eines kausalen Zusammenhangs zwischen einzelnen übermäßig aktiven Proteinkinasen und spezifischen Tumorformen wie z.B. bei der CML wurde anfänglich besonders die Entwicklung selektiver Proteinkinase-Inhibitoren angestrebt. Mögliche unerwünschte Effekte sollten auf diese Weise auf einem niedrigen Level gehalten werden.<sup>2</sup> Allerdings weisen die meisten bislang entwickelten Kinase-Inhibitoren auf Grund der starken Strukturhomologie innerhalb der Kinasefamilie keine Selektivität für einzelne Vertreter auf.<sup>7</sup>

Bei komplexen Erkrankungen wie Tumoren kann außerdem die Hemmung einer einzelnen Kinase unbedeutend für die gesamte fehlregulierte Signaltransduktion sein, durch andere Signalwege umgangen werden oder durch Mutationen unter der Therapie zu Resistenzen führen. Zusätzlich sind in beinahe allen Fällen nicht einzelne Genmutationen sondern die Kumulation veränderter Gene für die Tumorentstehung verantwortlich. Vor allem solide Tumore sind im Gegensatz zu Leukämien häufig in Bezug auf das Tumorüberleben nicht von einzelnen Signalwegen abhängig.<sup>7</sup>

Der simultane Eingriff an unterschiedlichen Stellen ganzer Signalwege stellt daher eine erfolgsversprechende Option in der Entwicklung neuartiger Kinaseinhibitoren dar.<sup>8</sup> In diesem Zusammenhang wird auch eine Inhibition der Kinasen Tumor-umgebender Zellen wie Endothelzellen von Blutgefäßen, die für die Tumorentwicklung wichtig sind, angestrebt.<sup>7</sup>

Für den Multikinase-inhibitorischen Ansatz können einerseits mehrere, auf einzelne Zielstrukturen gerichtete Inhibitoren kombiniert werden, um eine synergistische bzw. additive Wirkung zu erzielen. Andererseits können Inhibitoren entwickelt werden, die mehrere Kinasen gleichzeitig hemmen. Dabei wird ein „selektiv nichtselektives Hemmprofil“ angestrebt, um die für eine bestimmte Erkrankung verantwortlichen oder unterstützenden Zielstrukturen zu treffen. Ein optimales Gleichgewicht sollte zwischen einem möglichst breiten Inhibitionsspektrum für eine hohe Effizienz und der benötigten Selektivität zur Verhinderung von Nebeneffekten gefunden werden.<sup>7</sup>

Die bekannten Kinaseinhibitoren unterscheiden sich in der Anzahl und Art ihrer Zielstrukturen, die zum Teil erst mit beschleunigten und umfangreicheren Untersuchungsmethoden identifiziert wurden. Dabei ist die vollständige Charakterisierung des Kinaseinhibitorischen Profils der Substanzen von großer Bedeutung, um die für eine Tumorform adäquate Hemmung beteiligter Kinasen zu erreichen.<sup>8</sup>

### 1.3.4.3 Etablierte Proteinkinase-Inhibitoren

Als erster Proteinkinase-Inhibitor in der Behandlung von Tumoren wurde im Jahr 2001 Imatinib (**1**) (Glivec<sup>®</sup>, Novartis) auf den Markt gebracht. Imatinib bindet hochpotent an die inaktive Konformation der Kinasedomäne des onkogenen BCR-ABL-Fusionsproteins. Dieses wird vom sogenannten Philadelphia-Chromosom (Ph) kodiert, auf dem durch reziproke Translokation zweier Chromosomenabschnitte die Gene der Abelson (ABL)-Tyrosinkinase und des *break-point cluster* (BCR) fusioniert sind. Das exprimierte BCR-ABL-Onkoprotein weist konstitutive ABL-Tyrosinkinase-Aktivität auf, die eine kausale Rolle bei der Transformation und Proliferation hämatopoetischer Stammzellen in der Philadelphia-Chromosom positiven (Ph+, ca. 90% aller Fälle), chronisch-myeloischen Leukämie (CML) spielt. Die Inhibition der ABL-Kinasedomäne durch Imatinib wird als Erstlinien-Therapie bei neu-diagnostizierten Ph+-CML-Patienten in der anfänglichen chronischen Phase sowie bei Patienten nach erfolgloser Interferon-alpha-Therapie in der akzelerierten und der anschließenden Blastenphase der Erkrankung eingesetzt.<sup>21,33</sup>

In den fortgeschrittenen Stadien (akzelerierte Phase und Blastenkrise) der CML können allerdings durch Punktmutationen in der ABL-Kinasedomäne Resistenzen gegenüber Imatinib auftreten.

Weitere Proteinkinasen wie c-KIT und PDGFR werden von Imatinib inhibiert, so dass die Zulassung auf zusätzliche Therapieoptionen wie gastrointestinale Stromatumore, die durch eine Mutation des Protoonkogens *c-Kit* die Überexpression von c-KIT aufweisen, erweitert wurde.<sup>34</sup> Außerdem wird Imatinib beim Dermatofibromasarkom protuberans eingesetzt. Es handelt sich hierbei um einen seltenen malignen Tumor des Subkutangewebes, der eine Überexpression des Wachstumsfaktors PDGF-B aufweist. Diese Eigenschaft ermöglicht die Tumorthherapie durch den PDGFR-Inhibitor Imatinib.<sup>35</sup> Zur Überwindung der durch Mutationen der BCR-ABL-Kinasedomäne ausgelösten Imatinib-Resistenzen wurde eine zweite Generation von BCR-ABL-Inhibitoren entwickelt. Nilotinib (**2**) (Tasigna<sup>®</sup>, Novartis) ist seit 2007 zur Behandlung der Ph<sup>+</sup>-CML in der chronischen oder akzelerierten Phase mit Resistenz oder Unverträglichkeit gegenüber einer Vorbehandlung mit einem BCR-ABL-Inhibitor zugelassen.<sup>36</sup> Das gleichermaßen als Typ II-Inhibitor interagierende Nilotinib weist eine höhere Affinität gegenüber der BCR-ABL-Kinasedomäne im Vergleich zu Imatinib auf und hemmt die Mehrzahl der Imatinib-resistenten Punktmutanten von BCR-ABL.<sup>7</sup> Auch Nilotinib ist in der Lage, mit c-KIT und dem PDGFR zu interagieren.

Als Typ I-Inhibitor der BCR-ABL-Kinasedomäne wurde bereits 2006 Dasatinib (**3**) (Sprycel<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb) unter den gleichen Zulassungsbedingungen gegen die CML wie Nilotinib auf den Markt gebracht. Dasatinib sowie das momentan in der klinischen Phase III befindliche Bosutinib (Wyeth Pharmaceuticals) hemmen zusätzlich die SRC-Kinase. Diese duale SRC/ABL-Inhibition erweist sich als vorteilhaft, da die SRC-Kinase einen wichtigen Mediator in der BCR-ABL-Signalkaskade darstellt.

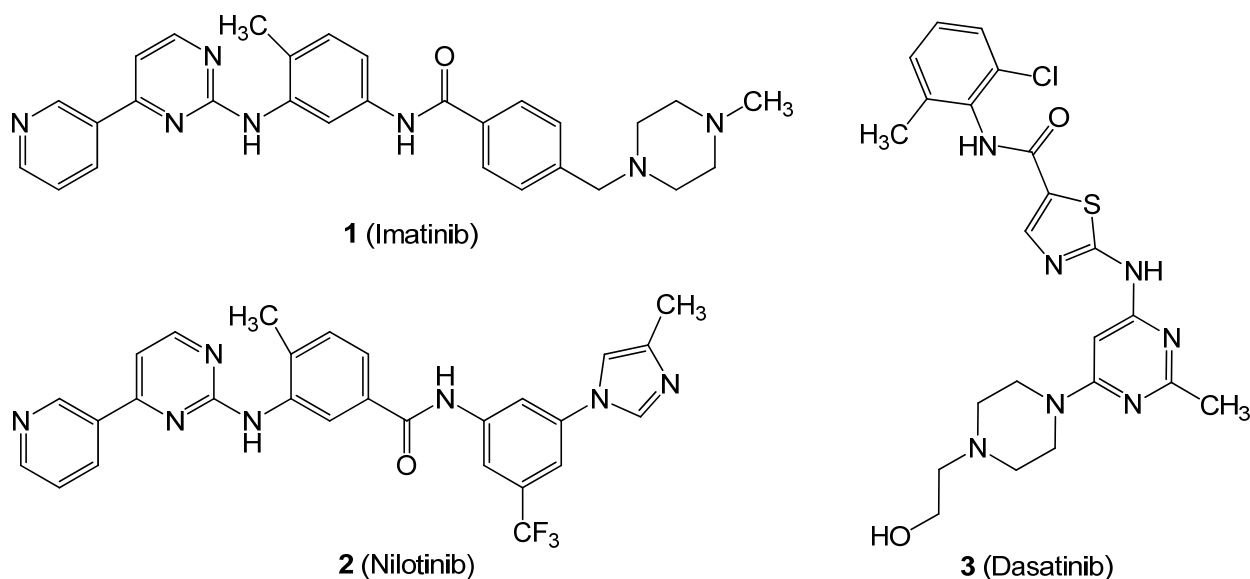


Abbildung 1-3: BCR-ABL-Inhibitoren zur Therapie der CML

Der nicht-kleinzellige Lungenkrebs (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) stellt die am häufigsten im Menschen auftretende Tumorart dar. Seine Entstehung wird mit einer Überexpression des EGFR (*epidermal growth factor receptor*) in Zusammenhang gebracht, die wiederum mit einer schlechten Prognose für den Krankheitsverlauf assoziiert ist.<sup>37</sup> Zusätzlich werden aktivierende Genmutationen des EGFR (HER1/ErbB1), der zur Familie der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen (HER1-4 bzw. ErbB1-4) gehört, im NSCLC beobachtet. Beide Effekte resultieren in einer verstärkten EGFR-Signaltransduktion, die zu Proliferation, Angiogenese und Metastasierung sowie Apoptosehemmung von Tumorzellen führt.<sup>38</sup>

Als erster EGFR-Inhibitor wurde Gefitinib (**4**) (Iressa<sup>®</sup>, AstraZeneca) 2003 von der FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) zur Therapie des lokal fortgeschrittenen oder metastasierenden NSCLC bei persistierender Erkrankung nach Chemotherapie mit Platin-Verbindungen oder Docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>, Sanofi-Aventis) zugelassen. Auf Grund eines beschleunigten Zulassungsverfahrens wurden nachfolgende Studien zum Nachweis des therapeutischen Nutzens von Gefitinib gefordert. Dabei ermittelte allerdings die ISEL-Studie (*Iressa<sup>®</sup> survival evaluation in lung cancer*) keine signifikant verlängerte Überlebensdauer der Patienten im Vergleich zu Placebo, so dass 2005 die Zulassung auf Patienten beschränkt wurde, die von der Fortführung einer Gefitinib-Therapie profitierten oder in klinische Studien involviert waren.

Trotz des Entzugs aus der Routineanwendung in der klinischen Praxis wurden weitergehende Studien mit Gefitinib im Vergleich zu etablierter Chemotherapie durch-

geführt. Die größte Patientenpopulation umfasste die INTEREST (*Iressa<sup>®</sup> non-small cell lung cancer trial evaluating response and survival against Taxotere<sup>®</sup>*)-Studie, aus der eine vergleichbare Effizienz des Gefitinibs zur etablierten Therapie resultierte.<sup>37</sup> Es wurde beobachtet, dass der Inhibitor verstärkt gegenüber bestimmten Mutationen des EGFR wirksam ist. Daher wurde Gefitinib 2009 in Europa zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen oder metastasierenden NSCLC bei Patienten zugelassen, bei denen eine Genmutation des EGFR in den Tumorzellen nachgewiesen wurde.<sup>39</sup>

Bereits 2004 wurde Erlotinib (**5**) (Tarceva<sup>®</sup>, Genentech/OSI), das in Studien erfolgreicher abschnitt, zur Therapie des trotz vorhergehender Chemotherapie persistierenden NSCLC von der FDA zugelassen. Zusätzlich wird Erlotinib in Kombination mit Gemcitabin bei lokal fortgeschrittenem, inoperablem oder metastasierendem Bauchspeicheldrüsenkrebs, in dem üblicherweise EGFR überexprimiert ist, eingesetzt.<sup>2,40</sup>

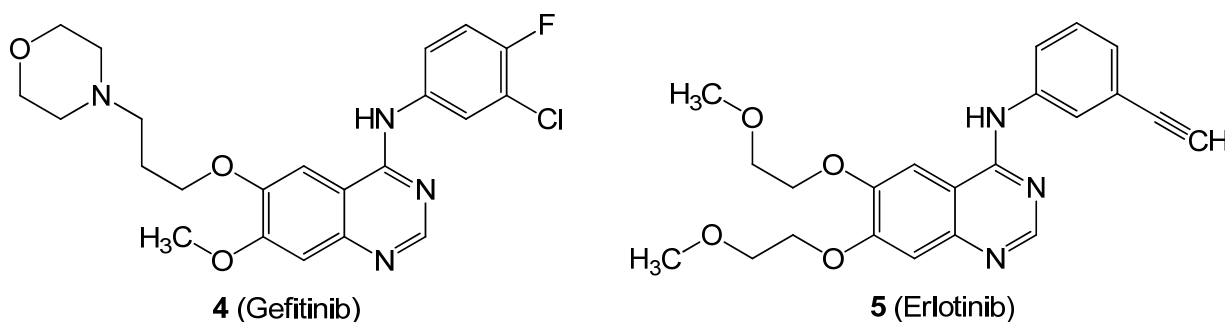


Abbildung 1-4: EGFR-Inhibitoren

Als erster prospektiv entwickelter dualer Kinaseinhibitor ist Lapatinib (**6**) (Tykerb<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline) in der Lage, EGFR und HER2 gleichzeitig mit hoher Spezifität gegenüber anderen Proteinkinasen zu hemmen. Durch die simultane Inhibition der zwei ErbB-Tyrosinkinasen wird eine größere Anzahl zellulärer Signalwege beeinflusst als durch Monokinase-Inhibition. Resistenzen, die bei der Hemmung einzelner ErbB-Kinasen durch Umleitung der Signaltransduktion über andere ErbB-Rezeptoren entstehen, können verhindert werden.<sup>7,41</sup> Auch Lapatinib ist zur Anwendung im Rahmen einer personalisierten Krebstherapie zugelassen [2007 (USA)/2008 (EU)]. Bei Überexpression des HER2-Rezeptors wird Lapatinib in Kombination mit dem Aromatasehemmer Letrozole (Femara<sup>®</sup>, Novartis) bei Hormonrezeptor-positivem, metastasierendem Brustkrebs oder mit Capecitabin (Xeloda<sup>®</sup>, Roche) bei fortschreitendem oder metastasierendem Brustkrebs nach durchgeführter Tumorthherapie eingesetzt.<sup>42</sup>

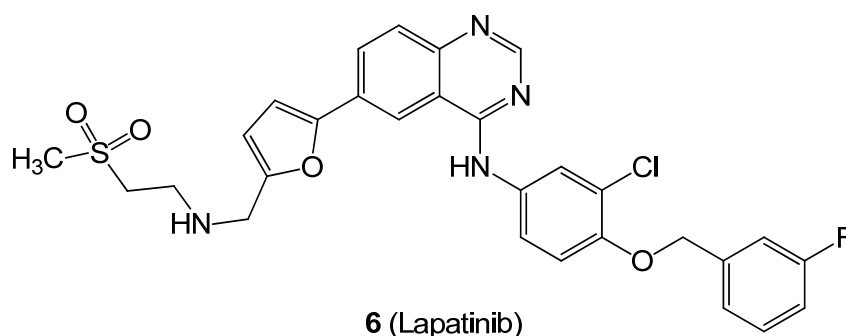


Abbildung 1-5: Dualer EGFR/HER2-Inhibitor

Durch rationales Design wurde Sorafenib (**7**) (Nexavar<sup>®</sup>, Bayer Schering Pharma AG) als Inhibitor der häufig in Tumoren überaktivierten Ser/Thr-Kinase RAF entwickelt. RAF-Kinasen sind Schlüsselenzyme des MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Signalwegs, der eine zentrale Rolle bei Proliferation und Zellüberleben spielt. Die Dysregulation übergeordneter RTKs oder aktivierende Mutationen der Mitglieder der MAPK-Signalkaskade führt zu Tumor- und Angiogenese.<sup>43</sup> Sorafenib weist allerdings durch die zusätzliche Hemmung pro-angiogenetischer und proliferativer Rezeptor-Tyrosinkinasen wie VEGF-R2 und 3, PDGFR- $\beta$ , c-KIT, RET und FLT3 Multikinase-inhibitorische Eigenschaften auf.

2006 (EU) wurde der Multikinase-Inhibitor zur Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms (*renal cell carcinoma*, RCC) nach dem Scheitern einer Zytokin-basierten Therapie zugelassen. Es handelt sich um einen stark vaskularisierten und chemoresistenten Tumor, der mit übermäßiger RAF-, EGFR- und VEGF-R-Aktivierung assoziiert ist.<sup>44-45</sup> Durch die Inhibition der oben genannten Proteinkinasen unterbindet Sorafenib sowohl die Proliferation als auch die Angiogenese, zwei bedeutende Effekte in der Tumorgenese.<sup>46</sup> Die Zulassung wurde 2007 (EU) auf die Therapie des Leberzellkarzinoms (*hepatocellular carcinoma*, HCC) erweitert, das als weltweit dritthäufigste Krebstodesursache ebenfalls durch Dysregulation verschiedener Wachstumsfaktor-Rezeptoren und des MAPK-Signalwegs charakterisiert ist.<sup>47</sup>

Etwa zeitgleich wurde der Multikinase-Inhibitor Sunitinib (**8**) (Sutent<sup>®</sup>, Pfizer) auf den Markt gebracht, der VEGF-R1-3, PDGFR- $\alpha$  und - $\beta$ , c-KIT, FLT3 und RET hemmt. Er ist inzwischen zugelassen zur Erstlinien-Therapie des fortgeschrittenen oder metastasierenden RCC und bei Patienten mit gastrointestinalem Stromatumor (GIST), deren Erkrankung mit Imatinib unzureichend behandelt ist.<sup>44,48-49</sup>

Die Verbindung Pazopanib (**9**) (Votrient<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline) ist ein Inhibitor des VEGF-R1-3, PDGFR- $\alpha$  und - $\beta$  und c-KIT. Seit 2010 (EU) wird er zur Therapie des fortgeschrittenen RCC eingesetzt. Gegenüber den anderen zugelassenen Multikinase-Inhibitoren zeigt sich bislang ein vorteilhaftes Toxizitätsprofil, vermutlich wird durch fehlende FLT-3-Inhibition das Zytopenie-Risiko unterbunden.<sup>50</sup> Die Zulassung wurde unter Auflagen erteilt, die weitere Daten aus einer laufenden Vergleichsstudie mit Sunitinib (*Pazopanib versus sunitinib in the treatment of subjects with locally advanced and/or metastatic renal cell carcinoma*, COMPARZ) bezüglich Wirksamkeit und Verträglichkeit fordern.<sup>51-52</sup>

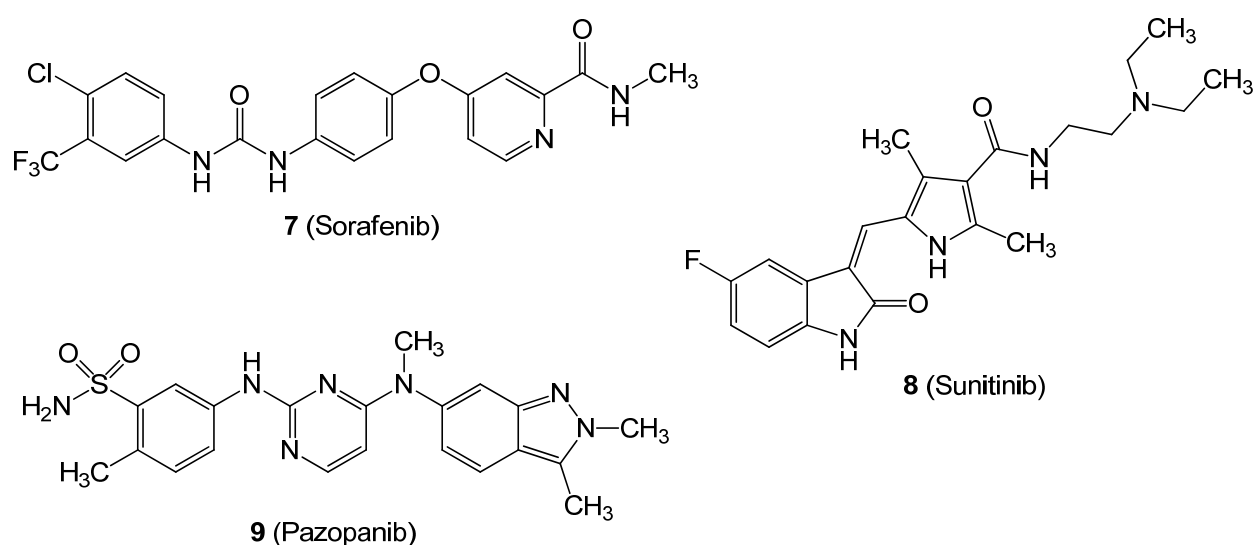


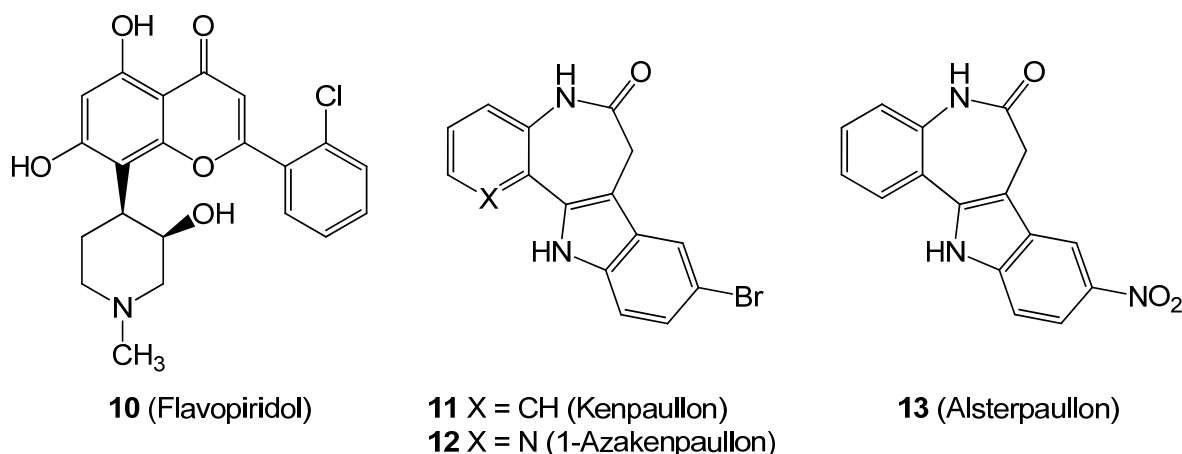
Abbildung 1-6: Multikinase-Inhibitoren zur Therapie des RCC

#### 1.3.4.4 Paullone als Proteinkinase-Inhibitoren

Eine Datenbank des *American National Cancer Institute* (NCI) speichert die Selektivitätsprofile tausender Wirkstoffe bezüglich ihrer antiproliferativen Aktivität gegenüber 60 humanen Tumorzelllinien. Durch einen systematischen Vergleich wurde Kenpaullon **11** mit großer Profilähnlichkeit zu dem CDK-Inhibitor Flavopiridol **10** (Alvocidip, Sanofi-Aventis) identifiziert. Flavopiridol weist eine umfassende CDK-inhibitorische Aktivität mit Präferenz für die CDK9 und Hemmung der GSK-3 $\beta$  auf.<sup>2,53</sup> Untersuchungen des Kenpaullons **11** ermittelten eine ATP-kompetitive Proteinkinase-Inhibition von CDKs und der GSK-3 im nanomolaren Bereich (CDK1/Cyclin B: IC<sub>50</sub> = 400 nM; GSK-3: IC<sub>50</sub> = 23 nM).<sup>54-55</sup>

Auf Grund einer moderaten antiproliferativen Aktivität gegenüber humanen Tumorzellen stellt Kenpaullon eine Leitstruktur der Paullonverbindungen dar. Mit der Entwicklung des

9-Nitroderivates Alsterpaullon **13** konnte sowohl eine höhere Kinase-inhibitorische (CDK1/Cyclin B:  $IC_{50} = 35 \text{ nM}$ ; GSK-3:  $IC_{50} = 4 \text{ nM}$ ) als auch antiproliferative Aktivität erzielt werden.<sup>56-57</sup> Eine Erhöhung der Selektivität für die GSK-3 gegenüber den CDKs konnte durch die Einführung eines Stickstoffatoms im 1-Azakenpaullon **12** erreicht werden, das eine hundertfach stärkere Inhibition der GSK-3 $\beta$  ( $IC_{50} = 18 \text{ nM}$ ) als des CDK1/Cyclin B-Komplexes ( $IC_{50} = 2.0 \text{ }\mu\text{M}$ ) aufweist.<sup>55</sup>



**Abbildung 1-7:** Flavopiridol **10** und Paullonderivate **11-13**

Zahlreiche Strukturmodifikationen dieses Indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-Grundkörpers führten bislang zu mehr als 300 Paullonderivaten, die hinsichtlich ihrer Struktur-Aktivitäts-Beziehungen untersucht wurden. Unter anderem zeigt die elektronenziehende Substitution in 9-Position eine vorteilhafte Verstärkung der CDK-Inhibition. Essentiell für die kinaseinhibitorische Aktivität sind die Lactamstruktur und ein unsubstituierter Indolstickstoff.

Obwohl die meisten Paullone *in vitro* eine antiproliferative Aktivität gegenüber zahlreichen Tumorzelllinien aufweisen, korreliert diese nicht mit der Stärke der CDK-Inhibition, so dass auf zusätzlich inhibierte Zielstrukturen geschlossen werden kann.<sup>58</sup> Als weiteres intrazelluläres Target wurde in diesem Zusammenhang die mitochondriale Malat-Dehydrogenase (mMDH) identifiziert.<sup>59</sup>

In einer Vielzahl chemischer und biologischer Forschungsgebiete werden Paullone als biochemische Werkzeuge eingesetzt. Insbesondere durch Ergebnisse im Bereich der Stammzellforschung, bei Untersuchungen zur Pathobiochemie diabetischer und neurodegenerativer Erkrankungen, der embryonalen Entwicklung und von apoptotischen Vorgängen sind Paullone von Bedeutung. Auch als Inhibitoren von spezifischen



Kinasen der parasitären Erreger tropischer Infektionskrankheiten spielen sie eine wichtige Rolle.<sup>60</sup>

## 1.4 Zelluläre Umgebung und Darstellung

### 1.4.1 Proteinkinasen als intrazelluläre Zielstrukturen

Proteinkinase-Assays an isolierten Enzymen werden als Standardverfahren zur Identifikation potentieller Kinaseinhibitoren eingesetzt. Durch umfassende HTS (*high throughput screening*)-Verfahren können Substanzen mit geringem Zeitaufwand hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber isolierten Kinasen untersucht werden. Anschließend sind zellbasierte Verfahren zur Bestimmung der biologischen Effektivität der in biochemischen Assays ermittelten Kinaseinhibitoren unbedingt erforderlich.

Einerseits sind die tatsächlichen, physiologischen Eigenschaften der Kinasen stark vom zellulären Kontext abhängig, da ihre Aktivität von der Lokalisation, vom Zellmilieu, der Substrat- und ATP-Konzentration sowie vom Vorliegen regulatorischer Proteine beeinflusst wird. Folglich kann die Aktivität eines Inhibitors im Vergleich zur Hemmwirkung gegenüber der isolierten Kinase verändert sein.

Andererseits müssen für einen effizienten Einsatz die niedrig-molekularen Kinaseinhibitoren zellgängig sein, da sich der katalytisch aktive Bereich sowohl der RTKs als auch der löslichen Tyr- und der Ser/Thr-Kinasen im Zellinneren befindet. Durch Zelltests kann die Membrangängigkeit überprüft werden. Zusätzlich wird durch Simulation der physiologischen Umgebung, in der der spätere Einsatz der Kinaseinhibitoren angestrebt wird, das Auftreten zusätzlicher oder unerwünschter Effekte untersucht.<sup>5,61</sup>

Zur Bestimmung der Kinaseaktivität in Zelltests können verschiedene Verfahren eingesetzt werden. Zum einen ist die Vermessung des phosphorylierten Substrates nach Lyse der Zellen möglich. In Screening-Verfahren werden hierfür vorwiegend nicht-radio-metrische Immunassay- (*enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) oder Fluoreszenzmethoden genutzt, die phosphoryliertes Substrat detektieren.

Zum anderen kann die Kinaseaktivität mit Hilfe von Lumineszenz-Verfahren (BRET oder FRET; Biolumineszenz- bzw. Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) ermittelt werden.<sup>5</sup>

Sie basieren auf der strahlungslosen Energieübertragung von einem Fluoreszenzdonor, der ein zur Fluoreszenz anregbares Protein oder ein biolumineszentes Enzym ist, auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor), dessen Strahlungsemission detektiert wird. Der Akzeptor wird nur bei ausreichender räumlicher Nähe der zwei BRET- bzw.

FRET-Moleküle zur Fluoreszenzemission angeregt. Daher können bei geeigneter Anbindung der Moleküle an spezifische Kinasebereiche sowie regulierende Proteine Konformationsänderungen oder Interaktionen verfolgt werden. Beispielsweise wird an die regulatorische und die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) die *Renilla*-Luciferase bzw. das grün-fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelt. Bei Assoziation der Untereinheiten ist das BRET-Signal detektierbar, während die durch allosterische Kinaseinhibitoren verhinderte Assoziation ein äquivalent zur inhibitorischen Aktivität reduziertes BRET-Signal verursacht.<sup>62</sup>

Eingeschränkt wird die Anwendung dadurch, dass genetische Veränderungen der eingesetzten Zellen erforderlich sind, um Kinasen zu exprimieren, die BRET- oder FRET-Proteine an bestimmten Stellen ihrer Struktur aufweisen. Zusätzlich können die Kinaseeigenschaften durch den sterischen Einfluss der gebundenen Lumineszenzproteine verändert sein.<sup>5</sup>

Überwiegend werden Zellassays jedoch weniger eingesetzt, um die Interaktion einer Substanz mit einem bestimmten Zielmolekül zu untersuchen sondern um die allgemeine antiproliferative bzw. zytotoxische Aktivität potentieller Wirkstoffe zu ermitteln. Im Bereich der Antitumorforschung werden vorrangig etablierte humane Karzinom-Zelllinien aus unterschiedlichen Geweben verwendet, die umfassend charakterisiert sind. Bei einzelnen Zelllinien wurde die Überexpression spezifischer Kinasen festgestellt, allerdings kann auf Grund weiterer potentieller Zielstrukturen in der Zelle aus diesen Assays kein kausaler Zusammenhang zwischen Kinase- und Proliferationshemmung abgeleitet werden.

### 1.4.2 Verfahren zur subzellulären Darstellung

Das Auftreten von zellulärer Inaktivität biochemisch aktiver Substanzen kann neben einer fehlenden Membrangängigkeit durch die Bindung an Membranen, die Anreicherung in bestimmten Kompartimenten oder Wechselwirkungen mit der DNA, dem Zytoskelett sowie zellulären Proteinen verursacht werden. Mit Hilfe verschiedener Methoden können Substanzen intrazellulär erfasst und visualisiert werden. Dadurch sind die Zellgängigkeit und das Verteilungsverhalten in der Zelle bestimmbar, wobei letzteres Rückschlüsse auf das intrazelluläre Verhalten und Interaktionen mit Zellstrukturen zulässt.<sup>61</sup>

Das Verfahren der MALDI IMS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Imaging Mass Spectrometry*) wird eingesetzt, um die Lokalisation von Proteinen, Peptiden und

niedrig-molekularen, biochemisch aktiven Substanzen in Gewebesektionen über die Intensität der entsprechenden Massenspektren zu bestimmen.<sup>63-64</sup> Die Infrarot-Mikrospektroskopie und Raman-Scanningverfahren liefern strukturelle Informationen zu den lokal detektierten Substanzen, besitzen jedoch ein geringes Auflösungsvermögen.<sup>65</sup> Schließlich können mit der Technik der mikroskopischen Autoradiographie Substanzen intrazellulär mit hoher Auflösung und Sensitivität dargestellt werden. Allerdings ist hierbei die radioaktive Markierung dieser Verbindungen erforderlich.<sup>66</sup>

Vor allem seit der Entwicklung fluoreszierender Proteine und Farbstoffe als *tags* nimmt die Fluoreszenzmikroskopie eine Schlüsselstellung unter den intrazellulären Darstellungsverfahren ein. Sie zeichnet sich durch die nichtinvasive Anwendbarkeit an lebenden Zellen sowie eine hohe Selektivität aus. Einerseits ist die Fluoreszenzmarkierung zellulärer Strukturen und Kompartimente möglich, so dass morphologische Veränderungen unter Zusatz biochemisch aktiver Substanzen beobachtbar sind und Hinweise auf Zielstrukturen und Wirkmechanismen geben.<sup>67</sup> Andererseits können auch zu untersuchende biochemische Wirkstoffe erfasst werden, wenn sie fluoreszieren oder zuvor mit Fluoreszenzmarkern konjugiert wurden. Da die Verknüpfung mit Fluorophoren die biochemischen Eigenschaften einer Substanz verändern kann, ist das Auftreten von Eigenfluoreszenz wie im Fall des Zytostatikums Doxorubicin von großem Vorteil.<sup>68</sup>

In einem konfokalen Laserscanning-Fluoreszenzmikroskop dient ein Laser als Strahlungsquelle, dessen Strahlung dabei in einem bestimmten Punkt der Probe fokussiert ist. An dieser Stelle werden Fluorophore zur Fluoreszenzemission angeregt. Während der Detektion wird Licht von außerhalb der Fokusebene eliminiert, so dass nur Informationen aus einer Bildebene erfasst werden. Durch rasterförmiges Abfahren der Probe und Veränderung der Fokusebene kann eine dreidimensionale, intrazelluläre Abbildung gewonnen werden.<sup>69</sup>

### 1.4.3 Fluorophore

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie werden intrazellulär fluoreszierende Moleküle detektiert. Intrinsische Fluoreszenz durch aromatische Aminosäuren in Proteinen oder enzymatische Cofaktoren wie NADH (reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) wird auf Grund ihres unspezifischen Auftretens und ihrer geringen Intensität nicht für Untersuchungen genutzt sondern als unerwünschte Hintergrundfluoreszenz registriert. Andererseits können in genveränderten Zellen fluoreszierende Proteine wie GFP (*green*

*fluorescent protein*) als genetisch kodierte Fluorophore für intrazelluläre, proteinogene Strukturen genutzt werden.<sup>70</sup>

Extrinsisch zugesetzte Fluorophore zur Markierung von Zellstrukturen können sich intrazellulär durch nicht-kovalente Wechselwirkungen in den lipophilen Teil von Biomembranen einlagern oder wie Ethidiumbromid mit der DNA interkalieren. Dagegen tritt eine kovalente Bindung von Fluorophoren unter anderem bei der Reaktion freier Aminogruppen von Proteinen mit Fluorescein auf.<sup>71</sup>

Für die Darstellung intrazellulär zu untersuchender Moleküle ohne Eigenfluoreszenz ist die Verknüpfung mit Fluorophoren von großer Bedeutung. Ein Beispiel hierfür ist die Nutzung von Fluorescein- und Rhodamin-Farbstoffen für die Markierung von Antikörpern.<sup>71</sup> Zahlreiche niedrig-molekulare, lumineszente Substanzen mit unterschiedlichen spektroskopischen und physikalischen Eigenschaften stehen dafür zur Verfügung. In diesem Zusammenhang werden die 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-Strukturen **14** (BODIPYs) besonders erfolgreich eingesetzt (Abb. 1-8).

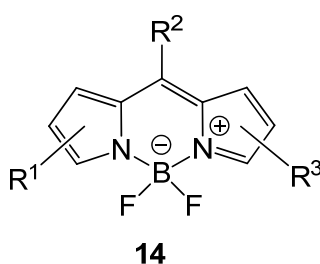


Abbildung 1-8: Allgemeine Struktur der BODIPYs **14**

Diese fluoreszierenden, heterozyklischen Borverbindungen mit üblicherweise hoher Quantenausbeute lassen durch geringe chemische Veränderungen ihres Grundkörpers eine starke Variation der optischen und physikalischen Eigenschaften zu.<sup>72-73</sup> Die BODIPYs und weitere Borkomplexe können neben der Nutzung als biochemische Marker bei der photodynamischen Therapie von Tumorerkrankungen (PDT) und in der Fotoelektronik eingesetzt werden.<sup>74</sup>

### 1.4.4 Photodynamische Therapie von Tumorerkrankungen

Die photodynamische Therapie (PDT) stellt eine minimal invasive Behandlung von Tumorerkrankungen mit Hilfe lichtempfindlicher chemischer Stoffe dar. Diese Photosensibilisatoren sind optimalerweise auf Charakteristika der entarteten Zellen zielgerichtet und akkumulieren dort selektiv, unterstützt durch verstärkt permeable Blutgefäße und

Plasmamembranen der Tumorzellen und verringerten Lymphabfluss. Die anschließende lokale Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge verursacht die Anregung der photoaktiven Substanzen. Aus dem energetisch angeregten Zustand ist der Übergang durch *intersystem crossing* in einen Triplettzustand möglich, der unter Anwesenheit von Sauerstoff die Entstehung von Sauerstoffradikalen (reaktive Sauerstoffspezies, ROS) oder Singulett-Sauerstoff auslösen kann. Diese verursachen die Tumorerstörung durch direkte zytotoxische Effekte, Beschädigung der Blutgefäße und einer Aktivierung des Immunsystems.<sup>1,75</sup>

Optimale Eigenschaften der photoaktiven Substanzen in der PDT werden durch die starke Bildung des angeregten Triplettzustandes, durch Absorptionsmaxima im Bereich langer, Gewebe-invasiver Wellenlängen, durch Selektivität für Tumorzellen und geringe allgemeine Toxizität beschrieben. Eine zusätzlich auftretende Fluoreszenzemission ermöglicht die visuelle Verfolgung der intrazellulären Abläufe.<sup>1</sup>

Klinisch etablierte Substanzen basieren vorrangig auf dem Porphyrin-Grundkörper, während sich kationische Verbindungen wie Methylenblau oder BODIPY-Derivate mit Iodsubstituenten als mögliche Photosensibilisatoren noch im Versuchsstadium befinden.<sup>76</sup>

## 2 Zielsetzung

### 2.1 Problemstellung

Die Entwicklung selektiver Monokinase-Inhibitoren basierte anfänglich auf dem Ziel, unerwünschte Wirkungen durch Beeinflussung weiterer Zielstrukturen zu vermeiden. Der Fokus verlagerte sich jedoch auf die Multikinase-Inhibition, da die Mutation einzelner Kinasen im Verlauf einer Tumorthherapie zu Resistenzen führen kann und meist zahlreiche Proteinkinasen in die komplexen Abläufe der Tumorgenese involviert sind. Außerdem zeigt jede Tumorform ein individuelles Expressionsmuster der an den neoplastischen Veränderungen beteiligten Kinasen. Es besteht daher ein großer Bedarf an Substanzen mit starker inhibitorischer Aktivität und neuartigen Kinaseinhibitionsprofilen.

Einige biochemische Wirkstoffe weisen in Proteinkinaseassays an isolierten Kinasen zufriedenstellende Inhibition auf, zeigen jedoch keinen Effekt in Zelltests. Somit ist die Durchführung antiproliferativer Assays mit Tumorzelllinien von essentieller Bedeutung für die Evaluation der Substanzeigenschaften in zellulärer Umgebung.

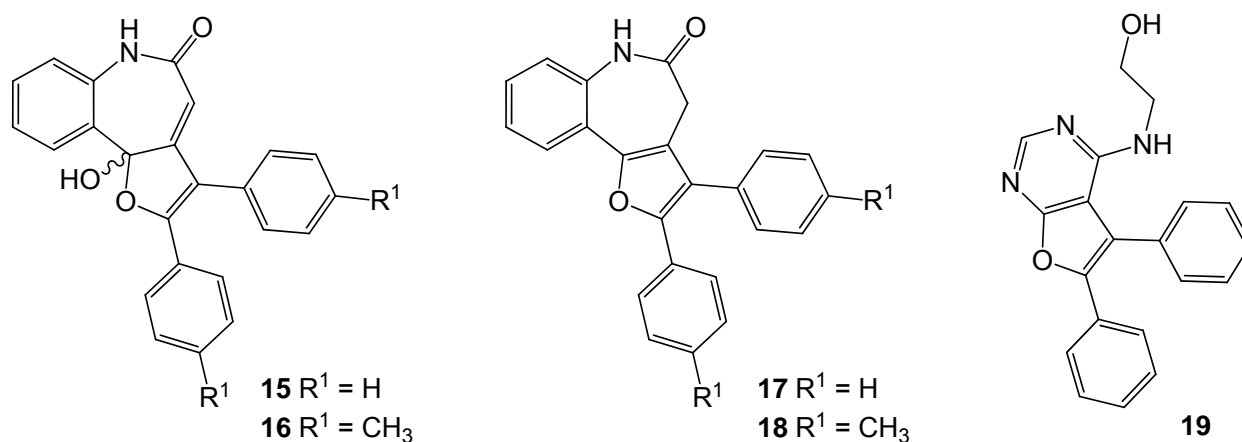
Eine detaillierte Verfolgung der intrazellulären Lokalisation von Kinaseinhibitoren ist durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen möglich. Dabei beeinflussen angehängte Fluoreszenzmarker jedoch die biochemischen Eigenschaften einer Substanz, so dass die Entwicklung biochemisch aktiver Verbindungen angestrebt wird, die basierend auf ihrer Grundstruktur zur Eigenfluoreszenz angeregt werden können.

### 2.2 Ziel der Arbeit

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Substanzen lassen sich in drei unterschiedliche Verbindungsklassen  $\alpha$ -anellierter 1-Benzazepinone gliedern. Basierend auf dem 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**) sollten neuartige Verbindungen dargestellt und bekannte Strukturen weiterentwickelt werden. Ziel war es anschließend, die biologische Aktivität aller Substanzen gegenüber isolierten Proteinkinasen und humanen Tumorzelllinien zu charakterisieren sowie die spektroskopischen Eigenschaften spezifischer Strukturen zu ermitteln und in Fluoreszenzdarstellungen zu nutzen.

Durch Modifikation der Reaktionsbedingungen sollte die Synthese des von Stukenbrock<sup>77</sup> entwickelten (*RS*)-10*b*-Hydroxy-2,3-diphenyl-6,10*b*-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]-benzazepin-5-ons (**15**) optimiert und nach dieser Umsetzungsmethode die Struktur in

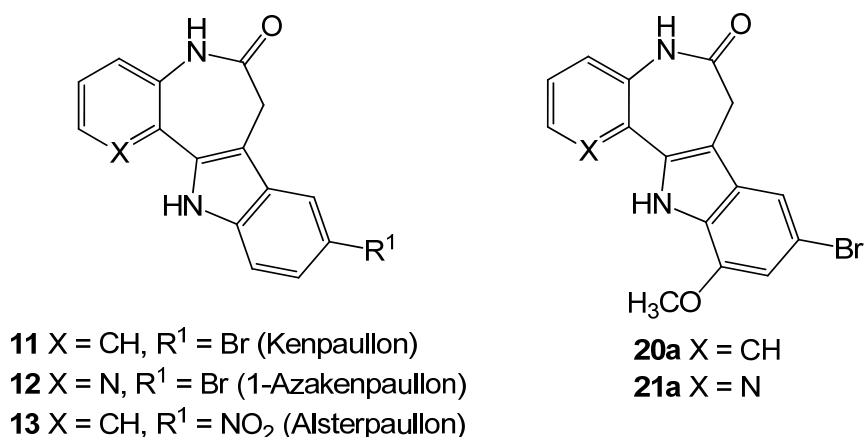
Form der *para*-methylsubstituierten Verbindung **16** erweitert werden. Eine anschließende Reduktion sollte die analogen Furanderivate **17** und **18** ergeben (Abb. 2-1).



**Abbildung 2-1:** Furanderivate **17** und **18**, ihre Vorstufen **15** und **16** sowie das Furano-pyrimidin **19**

Bei den dargestellten Verbindungen **15**, **16**, **17** und **18** besteht einerseits die Ähnlichkeit des Diphenylfuran-Strukturelementes mit dem von Coumar et al. entwickelten, nanomolaren Aurora A-Inhibitor **19**, andererseits basieren sie auf dem 1-Benzazepinon-Grundkörper der kinaseinhibitorisch aktiven Paullone (vgl. Abb. 2-2).<sup>55,78</sup> Sie wurden daher hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität gegenüber tumorrelevanten Proteinkinasen untersucht und die antiproliferative Wirkung der Verbindungen **15** und **17** auf humane Tumorzelllinien bestimmt. Docking-Posen von **17** in der Bindetasche der Aurora A und der zwei am stärksten inhibierten Kinasen sollten Unterschiede der molekularen Wechselwirkungen des Inhibitors mit den Enzymen darstellen.

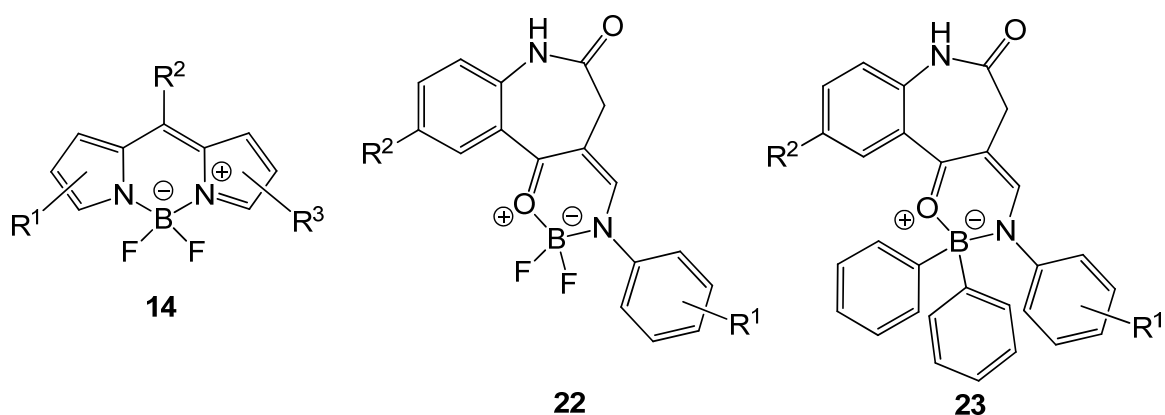
Die selektiven GSK-3/CDK-Inhibitoren Kenpaullon **11** und dessen 1-Azaanalogon **12** sollten durch eine 11-Methoxysubstitution strukturell weiterentwickelt werden.<sup>54-55</sup> In diesem Zusammenhang wurde die Darstellung der Verbindungen **20a** und **21a** angestrebt, die das spätere Einbringen löslichkeitsverbessernder Seitenketten in Position 11 ermöglichen sollten (Abb. 2-2).



**Abbildung 2-2:** 11-Methoxypaullone **20a** sowie **21a**, Kenpaullon **11**, 1-Azakenpaullon **12** und Alsterpaullon **13**

Ein potentieller Bindungsmodus von **21a** in der GSK-3 $\beta$  sollte unter besonderer Berücksichtigung der Ausrichtung des 11-Methoxysubstituenten einen Vergleich mit der Orientierung des ursprünglich kokristallisierten Inhibitors Alsterpaullon **13** ermöglichen. In Assays an GSK-3, Cyclin-abhängigen Kinasen und verwandten Enzymen sowie in einem *in vitro*-Zellassay sollte der Einfluss der 11-Methoxygruppe auf die biologische Aktivität der Paullone **20a** und **21a** untersucht werden.

In Anlehnung an die als Fluoreszenzmarker etablierten 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diazas-indacen-Derivate (BODIPYs, **14**)<sup>72</sup> sollte eine Bibliothek von Difluoroborkomplexen  $\alpha$ -anellierter 1-Benzazepinone **22** synthetisiert und in Form von Diphenylborverbindungen **23** weiterentwickelt werden (Abb. 2-3).



**Abbildung 2-3:** Allgemeine Struktur der BODIPYs **14** sowie Difluoro- und Diphenylborkomplexe **22** und **23**



Die kinaseinhibitorische Aktivität der Strukturen **22** und **23** gegenüber tumorrelevanten Proteinkinasen sollte ebenso bestimmt werden wie die Proliferationshemmung humaner Tumorzelllinien durch ausgewählte, stabile Verbindungen. Zusätzlich sollten die spektroskopischen Eigenschaften der Borkomplexe **22** und **23** ermittelt werden. Mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops sollte die intrazelluläre Verteilung spezifischer fluoreszierender Difluoroborverbindungen **22** in HT-29-Zellen dargestellt werden.

### 3 Synthesen

#### 3.1 Darstellung der Ausgangssubstanzen 1-Benzazepin-2,5-dion **24a** und Pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion **24b**

Zur Synthese *d*-anellierter Benz- und Pyridoazepinone wurden als Ausgangssubstanzen das 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**) und dessen Pyridoanalogon 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**24b**) eingesetzt.

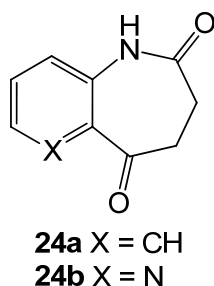
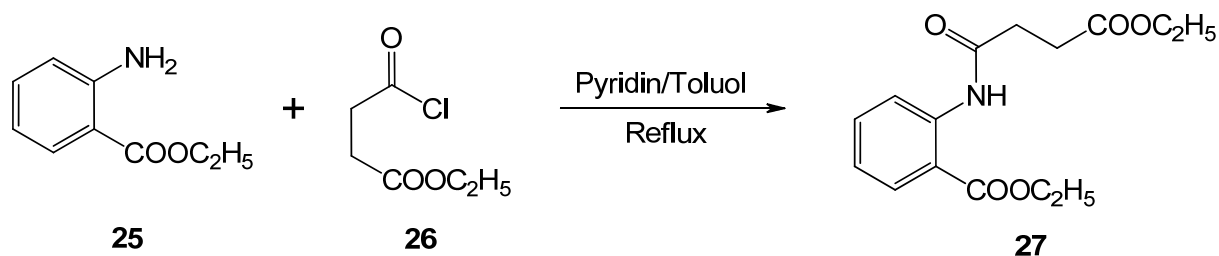


Abbildung 3-1: 1-Benzazepin-2,5-dion **24a** und Pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion **24b**

##### 3.1.1 Synthese des 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dions (**24a**)

Die dreistufige Darstellung des 1-Benzazepin-2,5-dions **24a** erfolgte nach Schultz<sup>79</sup> auf Basis einer von Kunick<sup>80</sup> entwickelten und durch Link<sup>81</sup> modifizierten Methode. Anthranilsäureethylester (**25**) wurde mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**26**) unter Zusatz von Pyridin als Base zum 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]benzoesäureethylester (**27**) umgesetzt (Schema 3-1).

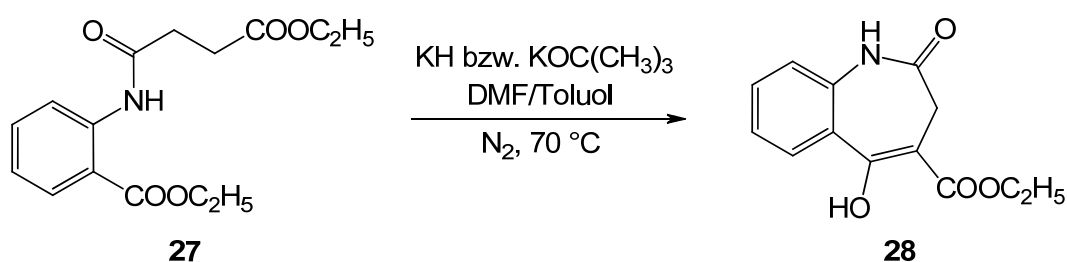


Schema 3-1: Darstellung des 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]benzoesäureethylesters (**27**)

Eine Dieckmann-Esterkondensation überführte das Amid **27** in den 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**28**) (Schema 3-2). Dieser

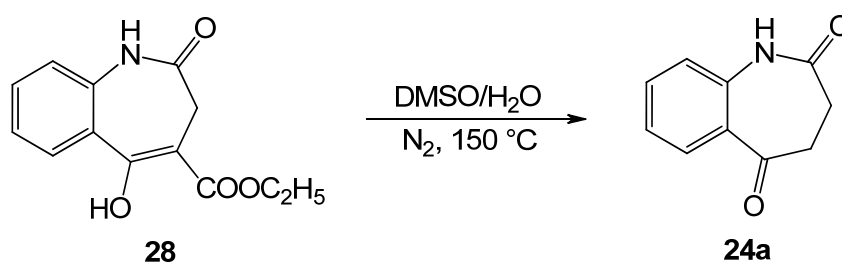
Ringschluss wurde nach Schultz<sup>79</sup> in Gegenwart von Kaliumhydrid durchgeführt und ergab eine Ausbeute von 83%.

Nachteilig ist bei dieser Reaktion die Verwendung von Kaliumhydrid, das auf Grund seiner hohen Reaktivität und Entzündlichkeit ein besonders großes Gefährdungspotential aufweist. Um die Sicherheit der Reaktion zu optimieren, wurde Kaliumhydrid äquimolar gegen Kalium-*tert*-butylat ausgetauscht, während die weiteren Reaktionsbedingungen beibehalten wurden. Dabei konnten 77% der theoretischen Ausbeute erzielt werden, so dass bei annähernd gleichem Ergebnis die Durchführbarkeit der Reaktion unter Sicherheitsaspekten deutlich verbessert werden konnte.



Schema 3-2: Ringschluss zum 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**28**)

Durch Dealkoxycarbonylierung des Esters **28** in wasserhaltigem Dimethylsulfoxid wurde das 1-Benzazepin-2,5-dion **24a** erhalten (Schema 3-3).

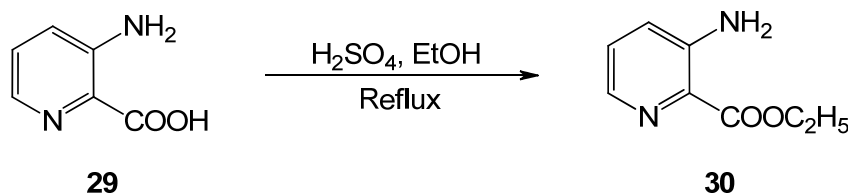


Schema 3-3: Dealkoxycarbonylierung zum 1-Benzazepin-2,5-dion **24a**

### 3.1.2 Synthese des 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dions (**24b**)

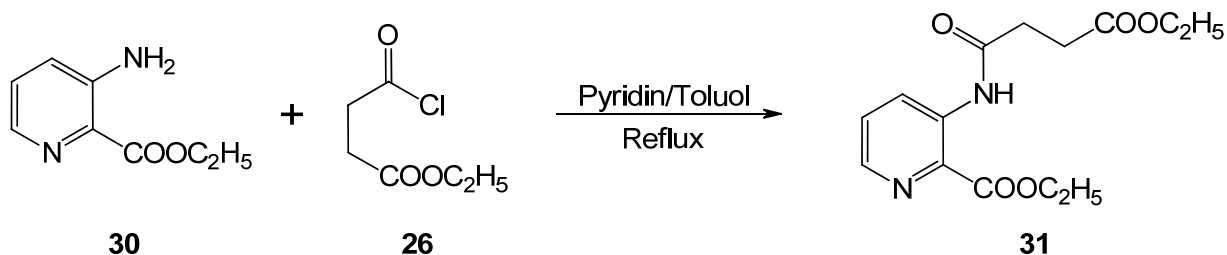
Zur Synthese des Pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dions **24b** über vier Stufen konnte von der kommerziell erhältlichen 3-Aminopicolinsäure (**29**) ausgegangen werden. Anhand einer Vorschrift von Stukenbrock<sup>77</sup> wurde die Säure **29** durch Refluxieren in getrocknetem

Ethanol unter Schwefelsäurezusatz zum 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (**30**) verestert (Schema 3-4).



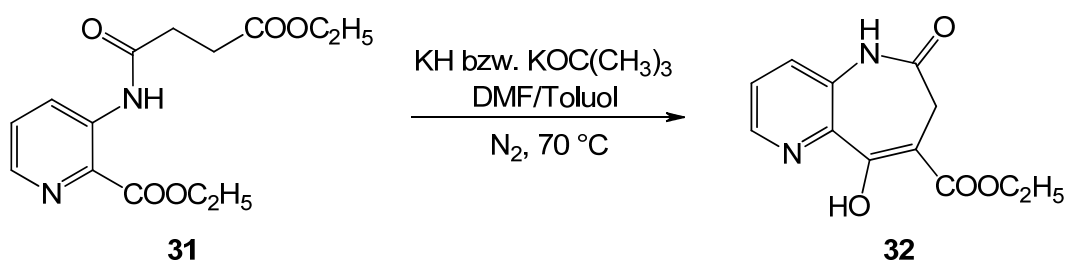
Schema 3-4: Darstellung des 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylesters (**30**)

Nach Lauenroth<sup>82</sup> wurde 3-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylester (**31**) durch Umsetzung des Esters **30** mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**26**) in Toluol mit Pyridin als Hilfsbase erhalten (Schema 3-5).



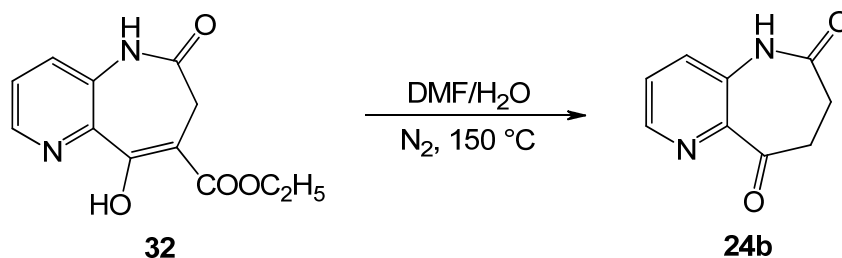
Schema 3-5: Synthese des 3-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylesters (**31**)

Analog zur Synthese des 1-Benzazepin-2,5-dions **24a** wurde der Ringschluss des Amids **31** mittels Dieckmann-Kondensation (Schema 3-6) zunächst mit Kaliumhydrid ausgeführt und dieses bei weiteren analogen Reaktionen erfolgreich durch Kalium-*tert*-butylat ersetzt. Die Ausbeute des 9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-carbonsäureethylesters (**32**) wurde von literaturbekannten<sup>77</sup> 48% auf 74% erhöht.



Schema 3-6: Ringschluss zum 9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-carbonsäureethylester (**32**)

Das 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**24b**) war abschließend durch Dealkoxycarbonylierung in wasserhaltigem DMF zugänglich (Schema 3-6).



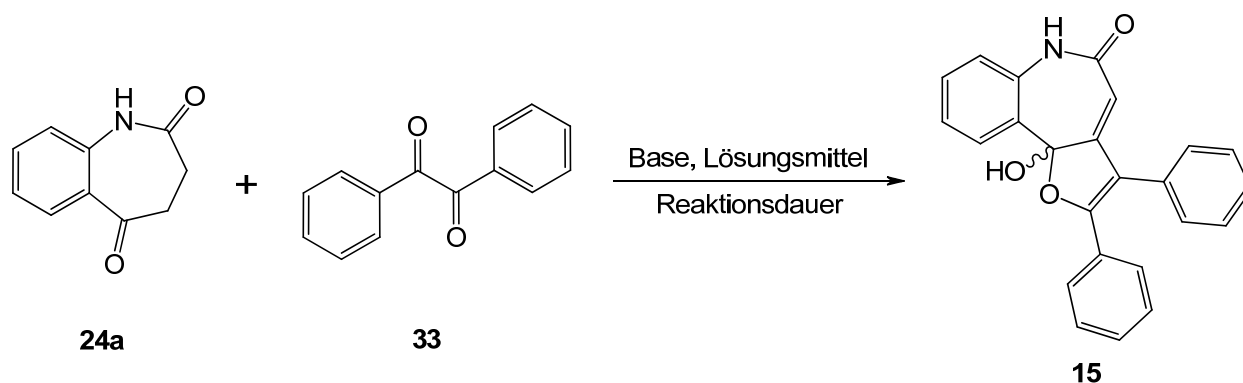
Schema 3-7: Dealkoxycarbonylierung zum Pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion **24b**

### 3.2 Synthese des 2,3-Diphenyl-4,6-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-ons (**17**) und dessen Analoga

Eine von Stukenbrock<sup>77</sup> beschriebene Kondensation des 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dions (**24a**) mit Benzil (**33**) zum Halbketal **15** (Schema 3-8) sollte optimiert und auf Benzilanaloga angewandt werden. Anschließend sollten durch eine Reduktion mit Zinn(II)chlorid, die für strukturell ähnliche 2-Alkylthio-2-buten-1,4-dione von Mosterd<sup>83</sup> beschrieben wird, die jeweiligen Furanderivate dargestellt werden.

#### 3.2.1 Synthese des Halbketals **15** und Reaktionsoptimierung

Zunächst wurde nach den von Stukenbrock benannten Reaktionsbedingungen<sup>77</sup> in Methanol und mit achteinhalbfachem molaren Überschuss Kaliumhydroxid als Base gearbeitet. Nach sechstägiger Umsetzung bei Raumtemperatur wurde das (*RS*)-10b-Hydroxy-2,3-diphenyl-6,10b-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**15**) in zehnprozentiger Ausbeute isoliert. Durch die Veränderung von Reaktionsdauer und Lösungsmittel sowie Art und Konzentration der Base sollte die Ausbeute erhöht werden.



**Schema 3-8:** Allgemeine Synthese des (*RS*)-10b-Hydroxy-2,3-diphenyl-6,10b-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-ons (**15**)

Der Ablauf der Reaktion wurde in unterschiedlichen Lösungsmitteln in Kombination mit Basen verschiedener Art und Konzentration systematisch in 0.1-mmolaren Ansätzen überprüft. Nach definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die mittels HPLC hinsichtlich ihrer Zusammensetzung untersucht wurden. Im jeweiligen Chromatogramm wurde der prozentuale Anteil der verbliebenen Edukte, des Produktes und auftretender Neben- oder Zwischenprodukte mit Hilfe der Flächen unter den zugehörigen Signalen über die 100%-Methode bestimmt (Tab. 3-1). Um eine hohe Ausbeute des Produktes **15** isolieren zu können, wurde nach Reaktionsbedingungen gesucht, die eine hohe Produktkonzentration im Reaktionsgemisch gewährleisten.

**Tabelle 3-1:** Anteil des Produktes **15** und der Summe der Neben-/Zwischenprodukte in 0.1-mmolaren Ansätzen gemäß Schema 3-8<sup>a</sup>

<b>Methanol</b>							<b>Propan-2-ol</b>		
	<b>8.5 Äq.<sup>b</sup> KOH</b>		<b>1.0 Äq.<sup>b</sup> KOH</b>		<b>0.1 Äq.<sup>b</sup> KOH</b>			<b>8.5 Äq.<sup>b</sup> KOH</b>	
Zeit	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>	Zeit	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>
2 h	2.6%	26.4%	0.6%	10.6%	0.3%	4.7%	2 h	6.0%	23.0%
6 h	5.5%	27.6%	0.8%	12.3%	0.1%	3.4%	6 h	18.0%	28.7%
24 h	10.8%	32.3%	1.7%	15.3%	0.3%	3.4%	24 h	46.5%	50.8%
48 h	12.6%	42.0%	2.2%	19.2%	0.3%	3.9%	48 h	46.1%	52.4%
144 h	18.6%	74.2%	2.7%	29.2%	0.5%	4.9%	144 h	39.7%	59.4%

**Tabelle 3-1:** Anteil des Produktes **15** und der Summe der Neben-/Zwischenprodukte in 0.1-mmolaren Ansätzen gemäß Schema 3-8<sup>a</sup> (Fortsetzung)

<b>Ethanol</b>					<b>Butan-1-ol</b>				
	<b>8.5 Äq.<sup>b</sup> KOH</b>		<b>8.5 Äq.<sup>b</sup> NaOEt</b>			<b>8.5 Äq.<sup>b</sup> KOH</b>		<b>8.5 Äq.<sup>b</sup> NaOH</b>	
Zeit	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>	Zeit	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>
2 h	6.9%	25.3%	6.3%	27.9%	2 h	8.7%	36.9%	7.2%	26.6%
6 h	9.7%	26.5%	14.5%	28.3%	6 h	11.6%	36.5%	11.3%	52.4%
24 h	11.4%	33.3%	22.6%	41.2%	24 h	14.4%	52.8%	16.1%	80.3%
48 h	12.9%	44.5%	27.6%	56.6%	48 h	17.1%	68.6%	16.4%	83.6%
144 h	16.5%	77.0%	31.9%	68.1%	144 h	18.5%	81.5%	17.3%	82.7%

<b>Tetrahydrofuran</b>										
	<b>8.5 Äq.<sup>b</sup> KOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>		<b>4.0 Äq.<sup>b</sup> KOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>		<b>2.0 Äq.<sup>b</sup> KOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>		<b>1.0 Äq.<sup>b</sup> KOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>		<b>0.1 Äq.<sup>b</sup> KOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>	
Zeit	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>
2 h	0%	97.1%	0%	94.7%	9.3%	32.0%	9.2%	15.9%	3.4%	6.4%
6 h	0%	98.9%	0%	99.1%	16.1%	30.9%	11.2%	15.3%	3.5%	7.2%
24 h	0%	100.0%	0%	100.0%	16.0%	36.7%	9.5%	16.1%	3.4%	7.5%
48 h	0%	100.0%	0%	100.0%	13.0%	44.1%	8.5%	18.6%	3.1%	9.1%
144 h	0%	100.0%	0%	100.0%	11.1%	45.3%	8.0%	18.6%	3.0%	7.8%

<sup>a</sup> Bestimmt durch HPLC, AUC 100%-Methode.

<sup>b</sup> Äq. = Äquivalente der Base im Vergleich zu äquimolar eingesetzten Edukten.

<sup>c</sup> NP/ZP = Summe der Neben- und Zwischenprodukte.

Nach sechstägiger Umsetzung wurde unter den Ausgangsbedingungen (Lösungsmittel Methanol, 8.5 Äquivalente Kaliumhydroxid) eine Produktkonzentration von 18.6% im Reaktionsgemisch ermittelt. Ein Austausch des Lösungsmittels gegen Ethanol oder Butan-1-ol bewirkte ebenso wenig eine Verbesserung des Ergebnisses wie der Austausch von Kalium- gegen Natriumhydroxid in Butan-1-ol. Eine Verringerung der Kaliumhydroxid-Konzentration in Methanol auf ein äquimolares oder 10<sup>-1</sup>-fach molares Verhältnis zu den Edukten zeigte einen nachteiligen Einfluss auf die Produktkonzentration.

Dagegen führte der Einsatz von 8.5 Äquivalenten Natriumethanolat in Ethanol zu einer Erhöhung des Produktanteils auf 31.9% nach 144 h. In Propan-2-ol hatten sich die Edukte in Gegenwart von 8.5 Äquivalenten Kaliumhydroxid nach 24 h zu 46.5% Halbketal **15** umgesetzt, dessen prozentualer Anteil sich mit zunehmender Reaktionsdauer zugunsten von Neben- und Zersetzungsprodukten verringerte.

In Tetrahydrofuran wurde mit Kalium-*tert*-butylat als starker Base in verschiedenen Konzentrationen gearbeitet. Unter Zusatz von 8.5 bzw. 4 Äquivalenten der Base entstand kein Produkt **15**, obwohl die Edukte **24a** und **33** bereits nach einem Tag nicht mehr detektiert werden konnten. Eine Zersetzung der Substanzen auf Grund der hohen Basenkonzentration kann vermutet werden. Die Ansätze mit geringeren Kalium-*tert*-butylat-Konzentrationen verzeichneten eine maximale Produktentstehung nach sechs Stunden. Mit zunehmender Reaktionszeit verringerte sich diese Konzentration wieder und der prozentuale Anteil der Neben- bzw. Zersetzungsprodukte stieg an.

Da in Propan-2-ol nach 24 h mit Kaliumhydroxid als Base die stärkste Umsetzung zum Halbketal **15** beobachtet wurde (46.5%), wurde unter diesen Bedingungen die Isolierung des Produktes **15** durch Fällung in Wasser und Neutralisation sowie anschließende Umkristallisation durchgeführt. Es wurde eine Ausbeute von 16% erzielt. Wie aus Tabelle 3-1 zu entnehmen ist, liegen nach 24 h Reaktionszeit neben dem Halbketal **15** mehr als 50% Neben- bzw. Zwischenprodukte vor. Diese konnten vom Produkt nicht vollständig abgetrennt werden. Eine denkbare Erklärung für diese Schwierigkeit ist in der möglichen strukturellen Ähnlichkeit der Neben- und Zwischenprodukte zum Produkt zu finden.

Zur weiteren Optimierung wurde daher auf solche Reaktionsbedingungen zurückgegriffen, die zu einer möglichst geringen Konzentration (< 25%) an Neben- bzw. Zwischenprodukten unter gleichzeitiger starker Produktentwicklung führten.

In Tetrahydrofuran wurden die Edukte **24a** und **33** äquimolar mit Kalium-*tert*-butylat für sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Beim Versuch, das Produkt durch Eingießen in Wasser und nachfolgende Neutralisation zu isolieren, entstand entweder ein sehr feiner oder ein harziger Niederschlag, aus dem das Halbketal **15** nicht rein erhalten werden konnte. Die Aufarbeitung wurde im Folgenden verändert, indem zunächst durch Eingießen des Ansatzes in *n*-Hexan eine Fällung durchgeführt wurde. Der hieraus resultierende Niederschlag wurde in Wasser gelöst bzw. suspendiert und aus diesem Medium durch Neutralisation erneut gefällt. Das isolierte Produkt wurde aus Aceton umkristallisiert.

Bei der anschließenden Vergrößerung des Reaktionsansatzes wurde nach 6 h ein umso höherer Produktanteil ermittelt, je umfangreicher die Ansatzgröße gewählt war (Tab. 3-2). In einem 2-mmolaren Ansatz entstanden 34.6% Halbketal **15**, von denen 23% in analysenreiner Form gewonnen werden konnten.



Tabelle 3-2: Produktanteil<sup>a</sup> [%] in verschiedenen Ansatzgrößen gemäß Schema 3-8<sup>b</sup>

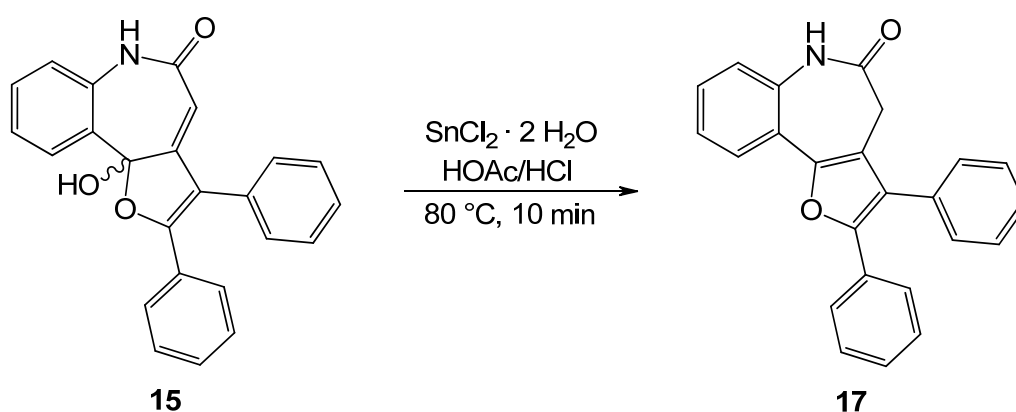
Zeit	0.1-mmolarer Ansatz		1.0-mmolarer Ansatz		2.0-mmolarer Ansatz	
	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>	Produkt	NP/ZP <sup>c</sup>
6 h	11.2%	15.3%	24.2%	18.7%	34.6%	24.4%

<sup>a</sup> Bestimmt durch HPLC, AUC 100%-Methode.<sup>b</sup> Lösungsmittel Tetrahydrofuran, äquimolare Konzentration an Kalium-*tert*-butylat.<sup>c</sup> NP/ZP = Summe der Neben- und Zwischenprodukte.

Resultierend wurde als optimale Reaktionsmethode eine sechsstündige Umsetzung in Tetrahydrofuran mit äquimolarer Kalium-*tert*-butylat-Konzentration bei Raumtemperatur definiert. Die oben beschriebene Aufarbeitungsmethode sowie eine möglichst umfangreiche Ansatzgröße ergaben im Vergleich zu der publizierten Darstellungsvorschrift eine deutlich verbesserte Ausbeute.

### 3.2.2 Reduktion zum 2,3-Diphenyl-4,6-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (17)

Das (*RS*)-10*b*-Hydroxy-2,3-diphenyl-6,10*b*-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (15) wurde nach einer Vorschrift von Stukenbrock<sup>77</sup>, basierend auf einer Veröffentlichung von Mosterd<sup>83</sup>, mit Zinn(II)chlorid-Dihydrat zum 2,3-Diphenyl-4,6-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (17) reduziert (Schema 3-9).

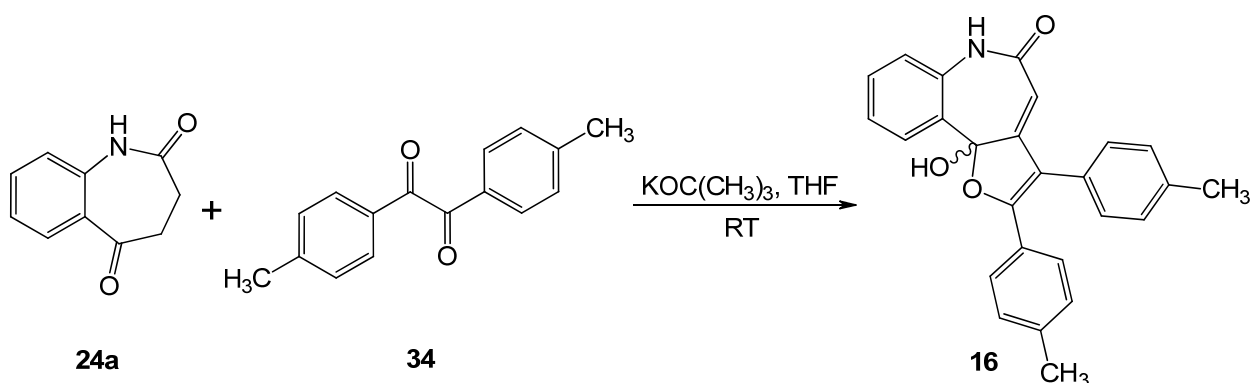


Schema 3-9: Reduktion zum 2,3-Diphenyl-4,6-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (17)

Durch sorgfältige Aufarbeitung konnte die Ausbeute des Produktes **17** von 43% (Literaturwert)<sup>77</sup> auf 71% erhöht werden.

### 3.2.3 Umsetzung des 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dions (**24a**) mit Benzil-Analoga

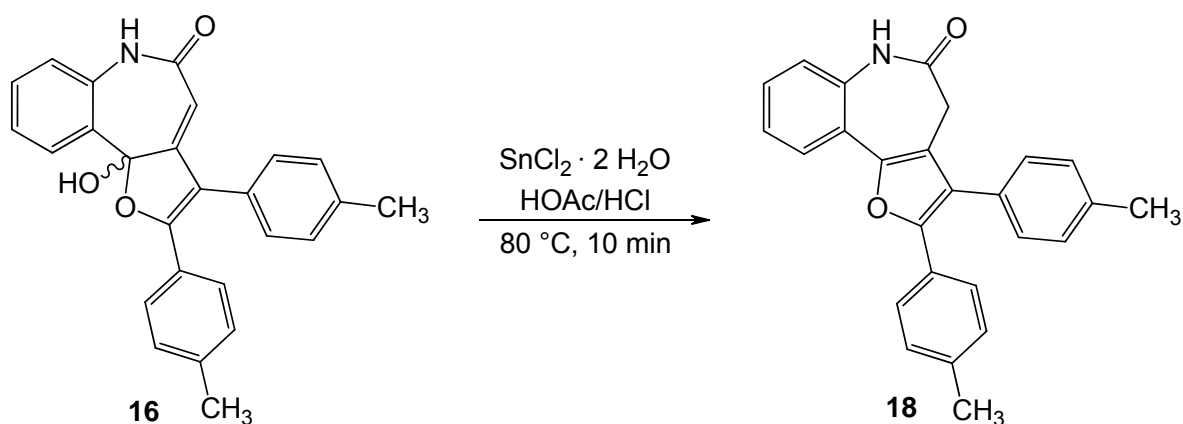
4,4'-Dimethylbenzil (**32**) wurde mit 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**) in Tetrahydrofuran in Gegenwart von zwei Äquivalenten Kalium-*tert*-butylat 18 h bei Raumtemperatur gerührt (Schema 3-10).



**Schema 3-10:** Umsetzung des 4,4'-Dimethylbenzils (**34**) zum Halbketal **16**

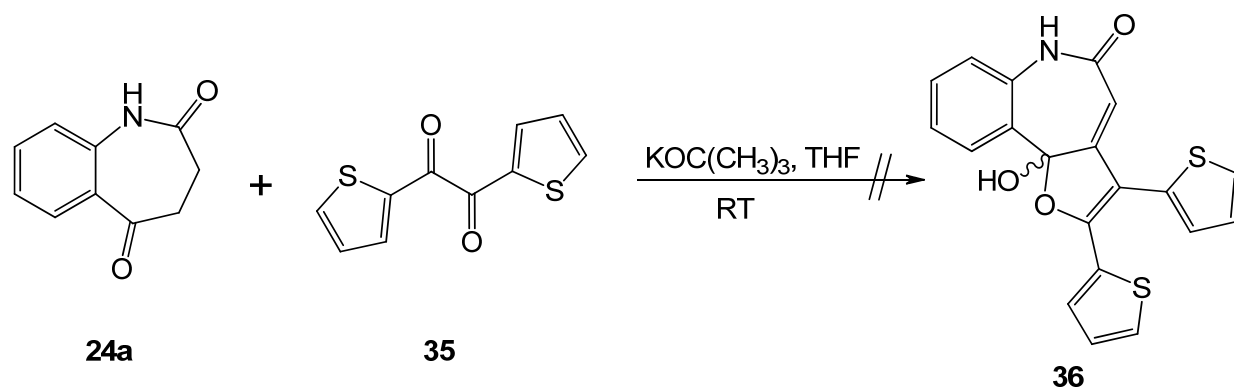
Nach Eingießen in Wasser und Neutralisation resultierte ein Niederschlag, aus dem nach Umkristallisation aus Ethylacetat das Produkt (*RS*)-10*b*-Hydroxy-2,3-bis(4-methylphenyl)-6,10*b*-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**16**) isoliert wurde. Weiterführende Untersuchungen zur Reaktionsoptimierung wurden nicht durchgeführt.

Im Anschluss erfolgte die Reduktion analog zur unsubstituierten Verbindung **15** mittels Zinn(II)chlorid-Dihydrat (Schema 3-11). Das Furanderivat 2,3-Bis(4-methylphenyl)-4,6-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**18**) wurde als Niederschlag isoliert.



**Schema 3-11:** Reduktion des Halbketals **16** zum 2,3-Bis(4-methylphenyl)-4,6-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**18**)

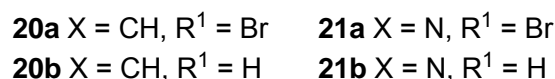
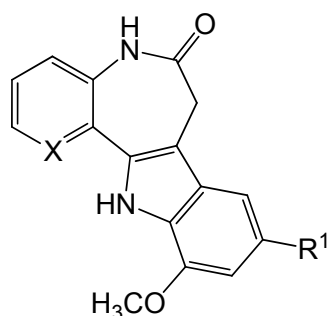
3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**) wurde des Weiteren mit dem Benzil-analogon 2,2'-Thenil (**35**) in Tetrahydrofuran in Gegenwart von einem oder zwei Äquivalenten Kalium-*tert*-butylat umgesetzt (Schema 3-12). Bei keiner dieser Reaktionsbedingungen konnte das (*RS*)-10b-Hydroxy-2,3-di(2-thienyl)-6,10b-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]-benzazepin-5-on (**36**) aus dem Reaktionsansatz isoliert werden.



Schema 3-12: Angestrebte Darstellung des (*RS*)-10b-Hydroxy-2,3-di(2-thienyl)-6,10b-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-ons (**36**)

### 3.3 Darstellung neuer 11-Methoxy-substituierter Indolo[3,2-*d*][1]-benzazepinone **20** und entsprechender 1-Azaanaloga **21**

Ausgehend von 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**) bzw. dessen Pyrido-analogon 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**24b**) sollten Indolo[3,2-*d*][1]-benzazepinone **20** sowie deren 1-Azaanaloga **21** mit Methoxysubstituenten in 11-Position dargestellt werden. Diese tetrazyklischen Verbindungen gehören zur Substanzklasse der Paullone und sind in einer Fischer-Indol-Synthese durch Umsetzung von **24a** bzw. **24b** mit den Phenylhydrazin-Derivaten **44** bzw. **46** zugänglich.

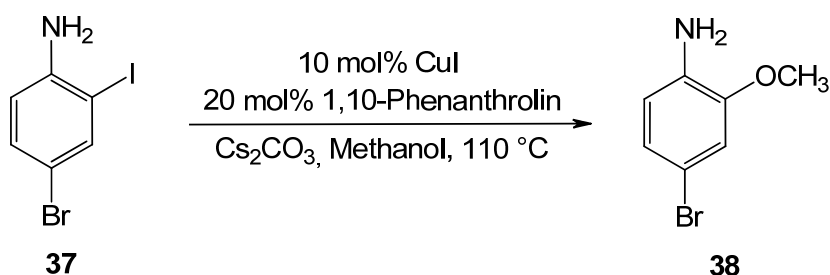


**Abbildung 3-2:** 11-Methoxy-indolo[3,2-*d*][1]benzazepinone **20** und Analoga **21**

### 3.3.1 Darstellung der Phenylhydrazine **44** und **46**

4-Brom-2-methoxyphenylhydrazin (**44**) sollte aus 4-Brom-2-methoxyanilin (**38**) durch Diazotierung und anschließende Reduktion synthetisiert werden. Die Ausgangssubstanz **38** sollte zunächst aus 4-Brom-2-iodanilin (**37**) und Methanol unter den von Wolter et al.<sup>84</sup> beschriebenen Reaktionsbedingungen hergestellt werden.

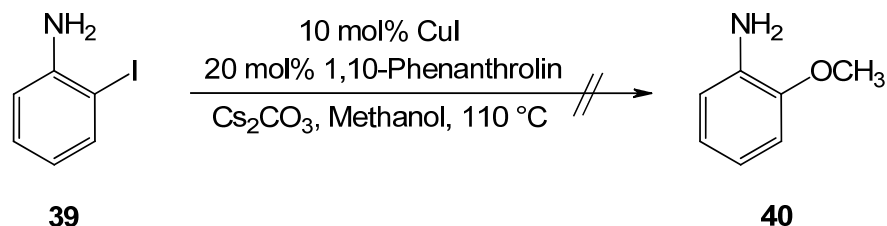
Im Gegensatz zu den scharfen Reaktionsbedingungen der Kupfer-katalysierten Ullmann-Reaktion stellten Wolter et al. unter milden Bedingungen verschiedene Alkylarylether aus Aryliodiden und aliphatischen Alkoholen her, so z.B. auch 4-Brom-2-methoxyanilin (**38**) und 2-Methoxyanilin (**40**) unter Verwendung von Cäsiumcarbonat als milder Base sowie Kupfer(I)-iodid und 1,10-Phenanthrolin als Katalysatorsystem. Es wurde in einem geschlossenen Reaktionsgefäß bei 110 °C gearbeitet (Schema 3-13).



**Schema 3-13:** Darstellung des 4-Brom-2-methoxyanilins (**38**) nach Wolter et al.<sup>84</sup>

Diese Reaktionsbedingungen sollten auf 2-Iodanilin (**39**) übertragen und an die Durchführung in einer Mikrowellen-Syntheseapparatur angepasst werden (Schema 3-14). In diesem geschlossenen System erfolgt eine gleichmäßigere Erwärmung des Reaktions-

gemisches durch Mikrowellen, wodurch eine Reaktionszeitverkürzung und eine Erhöhung der Ausbeute erzielt werden können.<sup>85</sup>

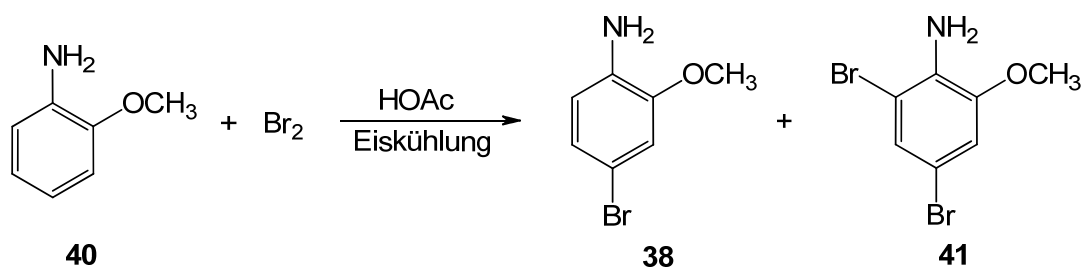


Schema 3-14: Angestrebte Darstellung von 2-Methoxyanilin (**40**)

Wolter et al. beschreiben allerdings, dass Anilinderivate der Aryliodide mit freien Amin-Resten durch Zersetzungsreaktionen des Ausgangsmaterials nur geringe Ausbeuten der Ether zulassen.<sup>84</sup> Dementsprechend ergab sich in der Mikrowellen-Syntheseapparatur unterhalb einer Temperatur von 110 °C keine Umsetzung des 2-Iodanilins (**39**). Oberhalb dieser Temperatur wurde unabhängig von der Reaktionsdauer ein komplexes Substanzgemisch isoliert, welches durch Säulenchromatographie nicht getrennt werden konnte.

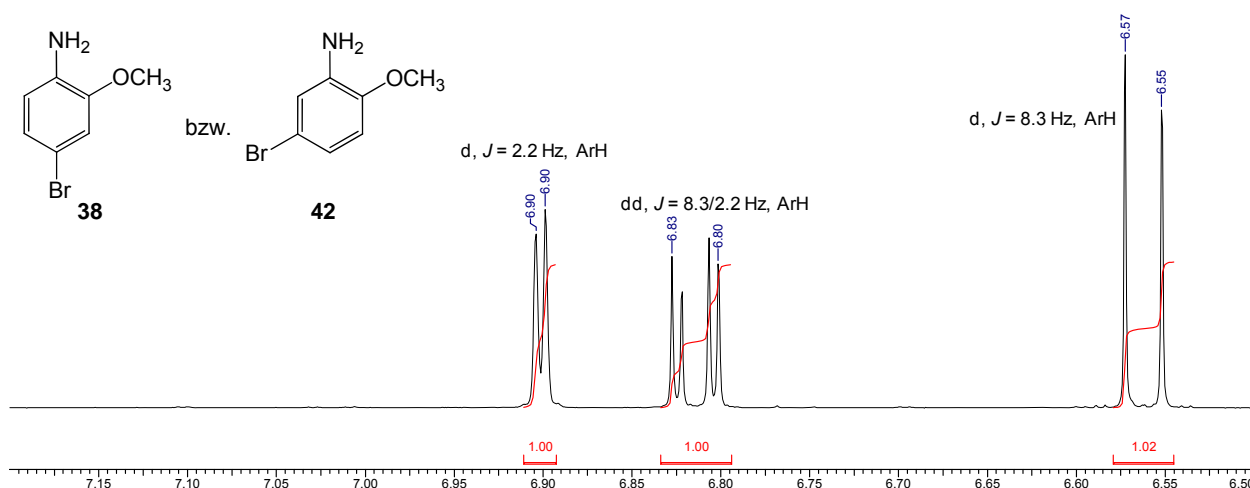
Auch das Refluxieren eines entsprechenden Reaktionsansatzes gemäß Schema 3-14 unter konventionellen Bedingungen führte zu einem nicht trennbaren Multi-komponentengemisch, so dass diese Methode der Ethersynthese nicht auf 4-Brom-2-iodanilin (**37**) übertragen werden konnte.

Um 4-Brom-2-methoxyanilin (**38**) zu erhalten, wurde deshalb nach Kohn<sup>86</sup> die Bromierung von 2-Methoxyanilin (**40**) angestrebt. Durch einen Überschuss an Brom entstand laut Fuchs<sup>87</sup> das disubstituierte Produkt 2,4-Dibrom-2-methoxyanilin (**41**), dagegen konnte Kohn<sup>86</sup> durch vorsichtige Bromierung vorrangig 4-Brom-2-methoxyanilin (**38**) synthetisieren (Schema 3-15). Dazu wurde unter Eiskühlung zu einer Lösung des Eduktes (**40**) in Eisessig eine äquimolare Menge Brom in Eisessig getropft.



Schema 3-15: Bromierung des 2-Methoxyanilins (**40**)

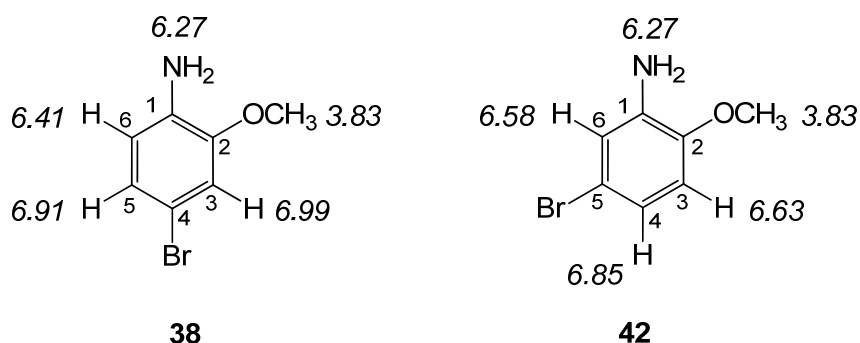
Ein entstandener Niederschlag wurde abfiltriert, in Wasser gelöst bzw. suspendiert und durch Neutralisation mit zehnpromzentiger Kaliumhydroxid-Lösung erneut gefällt. Aus dieser Fällung wurden je eine violette und eine farblose Kristallfraktion isoliert. Bei den farblosen Kristallen handelte es sich um ein monobromiertes Produkt, da im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum Signale dreier aromatischer Protonen (zwei Dubletts, ein Dublett vom Dublett) auftreten. Anhand der Kopplungskonstanten von 2.2 und 8.4 Hz kann festgelegt werden, dass sich zwei der aromatischen Protonen in *ortho*-Stellung zueinander befinden und ein drittes Proton zu einem dieser Ersten in *meta*-Position steht. Dadurch kann auf eine Bromierung in Position 4 (Verbindung **38**) oder 5 (Verbindung **42**) geschlossen werden (Abb. 3-3).



**Abbildung 3-3:** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums des monobromierten 2-Methoxyanilins (**38** bzw. **42**)

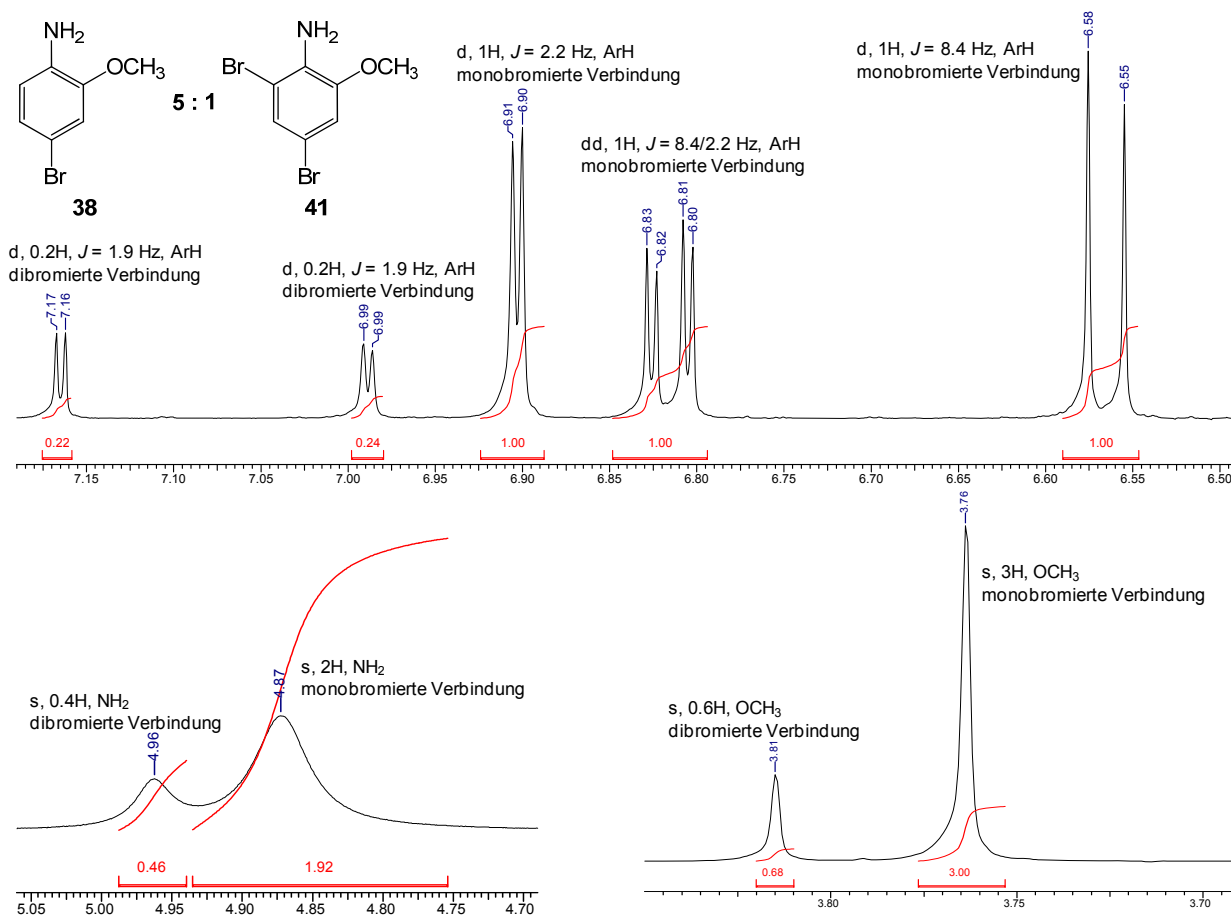
Mit Hilfe des Computerprogramms ChemBioDraw Ultra<sup>88</sup> (Version 12.0, CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA 02140 USA, 2010) wurde die chemische Verschiebung der Protonen beider Verbindungen **38** und **42** vorausgesagt. Es wurden die in Abbildung 3-4 dargestellten Werte ermittelt. Das vorhergesagte Signal des Protons, welches mit den Protonen an C3 und C6 koppelt, befindet sich bei **38** zwischen den Dubletts, wobei das Signal des C3-Protons am stärksten tieffeldverschoben ist. Dagegen wird im Spektrum von **42** die Verschiebung des Protons an C4, welches als Dublett vom Dublett aufspaltet, mit der höchsten Tieffeldverschiebung vorhergesagt. Diese Berechnungen weisen darauf hin, dass es sich bei der tatsächlich isolierten Substanz um die 4-Bromverbindung **38** handelt. Spätere Untersuchungen von

Produkten, die aus diesem Anilin-Derivat synthetisiert wurden, beweisen die 4-Stellung des Broms (vergleiche Kapitel 3.3.2).



**Abbildung 3-4:** Vorhergesagte chemische Verschiebung der Protonensignale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der bromierten 2-Methoxyaniline **38** und **42**, berechnet mit ChemBioDraw Ultra, Version 12.0<sup>88</sup>

Die oben beschriebenen violetten Kristalle bestanden aus einem Gemisch des Produktes **38** und eines Dibrom-Derivates **41** im Verhältnis 5:1 wie die Auswertung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums ergab (Abb. 3-5). Neben dem vollständigen Signalsatz für die Protonen des monosubstituierten Derivates finden sich mit geringerer Intensität die Singulett der Aminogruppe und des Methoxysubstituenten sowie zwei Dubletts mit einer Kopplungskonstante von  $J = 1.9 \text{ Hz}$  im Spektrum. Die Größe dieser Konstante lässt auf eine *meta*-Stellung der Protonen am Aromaten schließen. Da laut Kohn<sup>86</sup> davon ausgegangen werden kann, dass zunächst die Monobromierung in 4-Position und anschließend die zweite Substitution stattgefunden hat, wird die 4,6-Dibromierung vermutet.

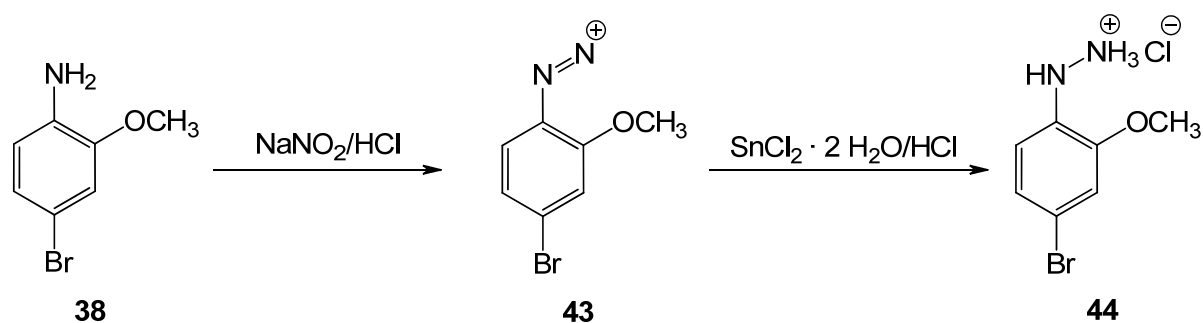


**Abbildung 3-5:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Gemisches aus mono- und dibromiertem 2-Methoxyanilin (**38** und **41**)

Durch Diazotierung<sup>89</sup> primärer aromatischer Amine und anschließender Reduktion können die entsprechenden Arylhydrazine erhalten werden. Nach einer Vorschrift für die allgemeine Darstellung<sup>89</sup> von Arylhydrazinen wurde **38** zum 4-Brom-2-methoxyphenylhydrazin (**44**) umgesetzt.

Unter Kühlung wurde das Anilin-Derivat **38** in salzsaurem Milieu mit der Lösung einer äquimolaren Menge Natriumnitrit versetzt. Das Diazoniumion **43** wurde nicht isoliert, sondern direkt unter Zugabe von Zinn(II)chlorid-Dihydrat zum Reaktionsansatz reduziert (Schema 3-16). Das durch Reduktion entstandene, unlösliche Produkt **44** konnte abgetrennt werden.





Schema 3-16: Darstellung des 4-Brom-2-methoxyphenylhydrazins (**44**)

Die für das Phenylhydrazin-Hydrochlorid **44** berechnete, maximale Ausbeute wurde durch den isolierten Niederschlag um ein Vielfaches übertroffen. Vermutlich enthielt der Niederschlag noch größere Anteile von Zinn-Doppelsalzen des Typs **44a** (Abb. 3-6).<sup>89-90</sup>

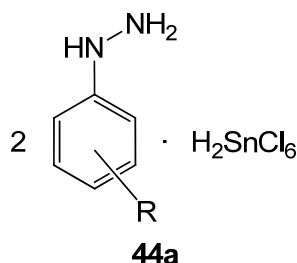
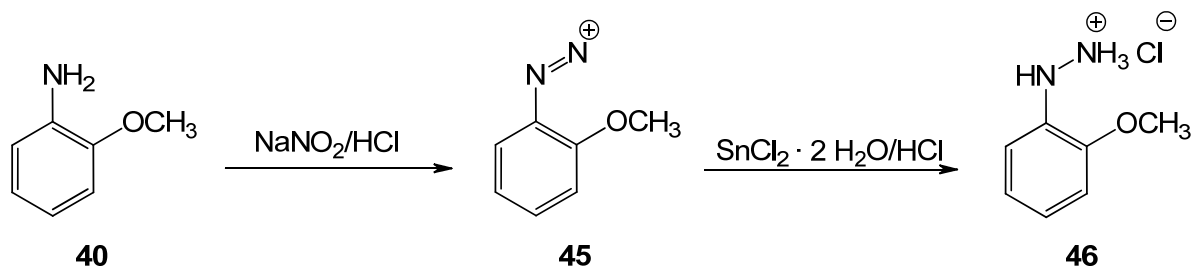


Abbildung 3-6: Zinn-Doppelsalz von Arylhydrazinen

Zu deren Entfernung wurde der Niederschlag in Wasser dispergiert, unter Kühlung mit einem Überschuss konzentrierter Natriumhydroxid-Lösung (32%) alkalisiert und mit *tert*-Butylmethylether die Phenylhydrazin-Base aus der wässrigen Phase extrahiert.<sup>91</sup> Durch Einleitung von Chlorwasserstoff-Gas in die organische Phase wurde aus dieser das Hydrochlorid des Phenylhydrazins **44** gefällt.

Zur Darstellung des 2-Methoxyphenylhydrazins (**46**) konnte von 2-Methoxyanilin (**40**) ausgegangen werden. Es wurde analog zur Synthese von **44** unter Kühlung in konzentrierter Salzsäure durch Natriumnitrit diazotiert und mit Zinn(II)chlorid-Dihydrat zum 2-Methoxyphenylhydrazin (**46**) reduziert (Schema 3-17).



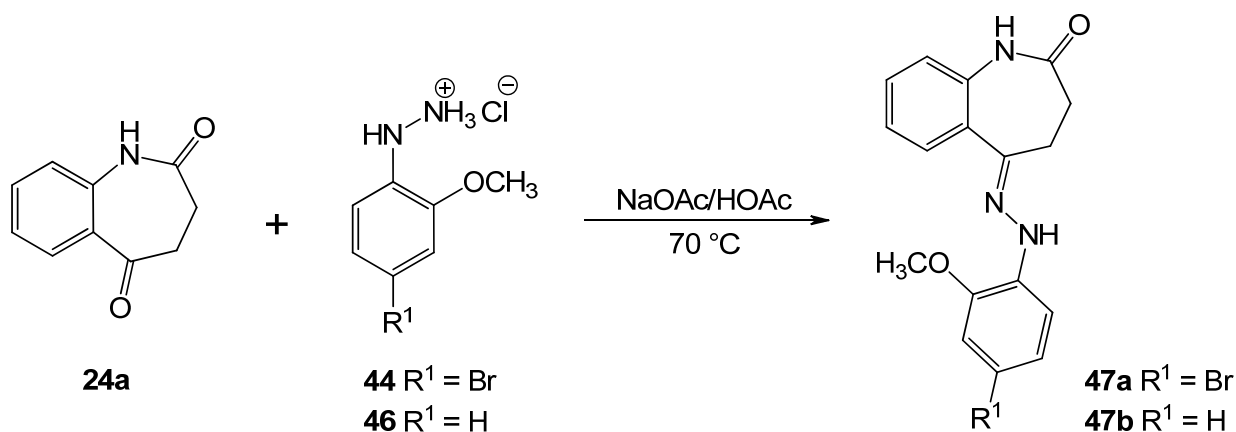
**Schema 3-17:** Synthese des 2-Methoxyphenylhydrazins (**46**)

Zum Aufschluss der Zinnsalze wurde ebenfalls unter Kühlung eine Alkalisierung durch Natriumhydroxid-Lösung durchgeführt, die freie Phenylhydrazin-Base mit *tert*-Butylmethylether extrahiert und aus diesem durch Einleiten von Chlorwasserstoff-Gas das Hydrochlorid **46** gefällt.

### 3.3.2 Synthese der 11-Methoxy- und 9-Brom-11-methoxy-substituierten 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one **20**

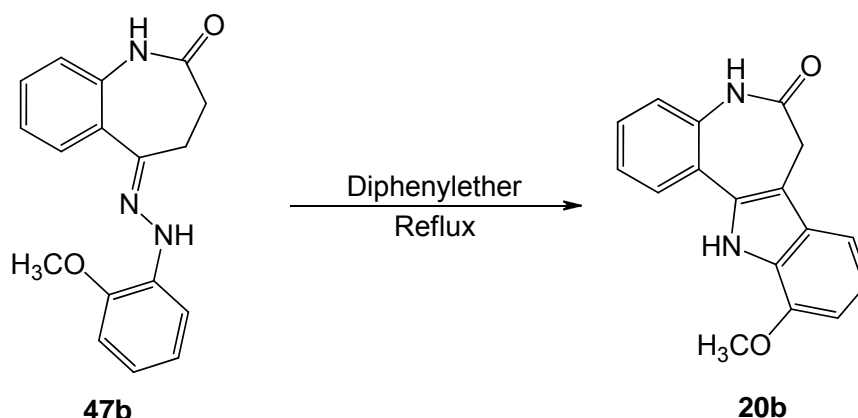
In einer Fischer-Indol-Synthese lässt sich 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**) mit verschiedenen Phenylhydrazin-Derivaten zum jeweiligen Indolo[3,2-*d*][1]benzazepinon umsetzen<sup>79</sup>. Diese Indolbildung kann säurekatalysiert auf direktem Weg durchgeführt werden oder nach der Isolierung einer entsprechend substituierten Hydrazon-Zwischenstufe thermisch angeregt werden.

Durch die Reaktion von **24a** mit 4-Brom-2-methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid (**44**) bzw. 2-Methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid (**46**) konnten unter Zusatz äquimolarer Mengen Natriumacetat in Eisessig die Hydrazone **47** gewonnen werden (Schema 3-18).



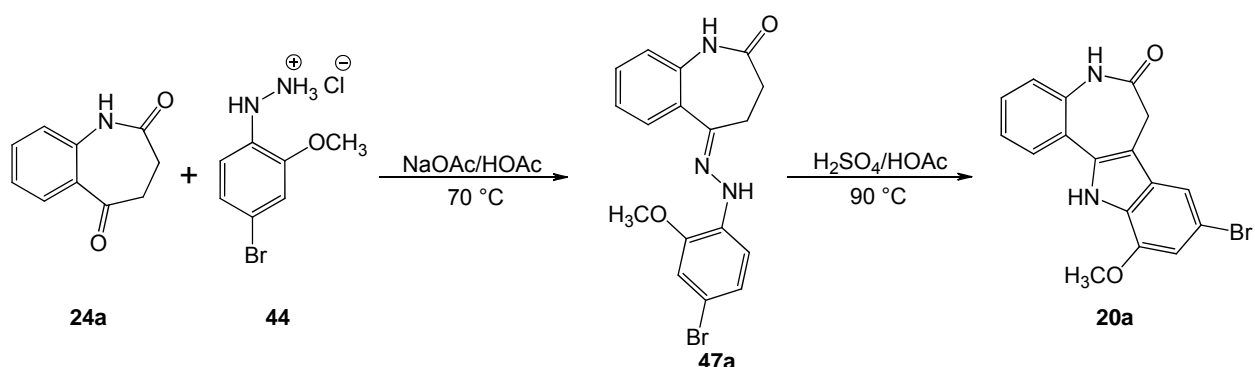
**Schema 3-18:** Darstellung der 1-Benzazepin-2,5-dion-5-phenylhydrazone **47**

Das Hydrazonderivat **47b** wurde anschließend durch thermische Fischer-Indol-Synthese in refluxierendem Diphenylether zum 11-Methoxy-substituierten Paullon **20b** ringgeschlossen und durch Ausfällung aus *n*-Hexan erhalten (Schema 3-19).



Schema 3-19: Ringschluss zum 11-Methoxy-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**20b**)

Dagegen konnte das 9-Brom-11-methoxypaullon **20a** ohne Isolierung des Hydrazon-intermediates direkt synthetisiert werden. In Eisessig wurde unter Erwärmen zunächst die vollständige Bildung des Zwischenproduktes **47a** dünnschichtchromatographisch festgestellt und anschließend durch die Addition einer katalytischen Menge konzentrierter Schwefelsäure der Ringschluss induziert (Schema 3-20). Eine Abtrennung von Nebenprodukten erfolgte durch präparative HPLC.



Schema 3-20: Synthese des 9-Brom-11-methoxy-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ons **20a**

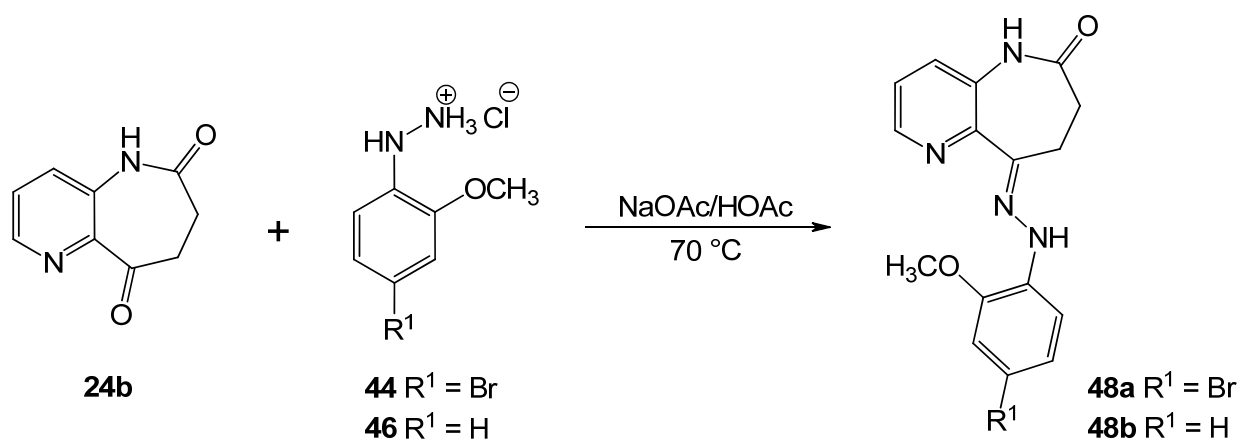
Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **20a** treten die Signale der Protonen an den Kohlenstoffatomen in Position 8 und 10 als Dubletts bei  $\delta_{\text{H}} = 6.87$  und  $7.51$  ppm auf. Die

Kopplungskonstante beträgt  $J = 1.5$  Hz. Dieser geringe Wert lässt auf eine *meta*-Stellung der Protonen zueinander schließen. Daraus folgt, dass wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben das 4-Brom-2-methoxyanilin (**38**) und nicht das in 5-Position bromierte Anilinderivat **42** synthetisiert worden war.

### 3.3.3 Synthese der 11-Methoxy- und 9-Brom-11-methoxy-substituierten

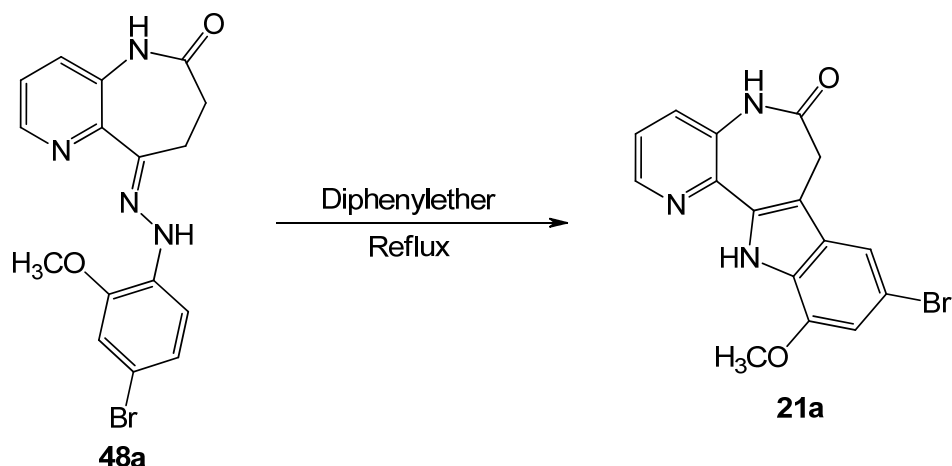
#### 7,12-Dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-one **21**

Die 1-Azaderivate der Paullone können ebenfalls durch eine Fischer-Indol-Synthese ausgehend vom Pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion **24b** erhalten werden.<sup>77</sup> In Übereinstimmung mit der Darstellung der Carbanaloga wurden zunächst die Hydrazonintermediate **48** synthetisiert (Schema 3-21). Ein reines Produkt **48b** konnte durch Abtrennung von Nebenprodukten mittels präparativer HPLC erhalten werden, **48a** war durch Umkristallisation zugänglich.



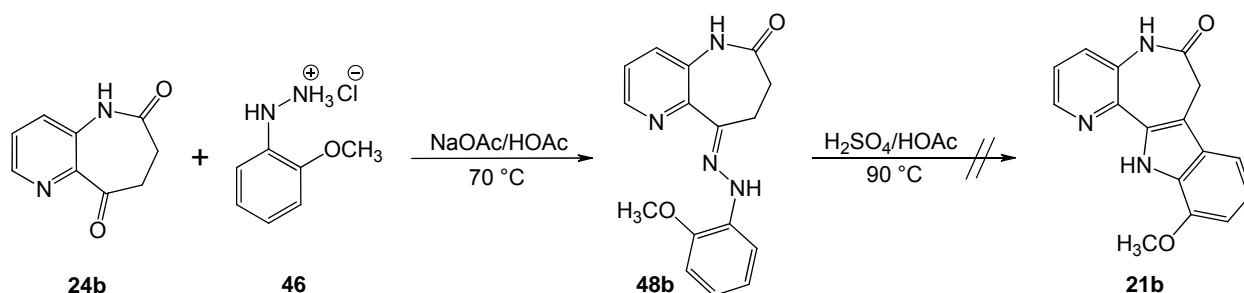
Schema 3-21: Darstellung der Pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-phenylhydrazone **48**

Durch thermische Induzierung des Indol-Ringschlusses in refluxierendem Diphenylether konnte aus **48a** das 9-Brom-11-methoxy-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**21a**) hergestellt werden (Schema 3-22).



**Schema 3-22:** Synthese des 9-Brom-11-methoxy-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-ons (**21a**)

Zur Vermeidung von Substanzverlusten wurde angestrebt, das 11-Methoxyderivat **21b** ohne Isolierung des Hydrazons aus den Edukten **24b** und **46** in einer Eintopfsynthese herzustellen. Eine dünnschichtchromatographische Überwachung bestätigte die Umsetzung der Edukte zum Hydrazon. Allerdings konnte durch die sich direkt anschließende saure Katalyse der Ringschluss zum 11-Methoxy-substituierten 1-Azapaulon **21b** nicht erfolgreich durchgeführt werden (Schema 3-23).



**Schema 3-23:** Angestrebte Darstellung des 11-Methoxy-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]-azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-ons (**21b**)

### 3.4 Fluoreszierende Borkomplexe als *d*-anellierte 1-Benzazepinone

#### 3.4.1 Hintergrund zur Synthese von Borverbindungen

Das Nichtmetall Bor besitzt als fünftes Element des Periodensystems drei Valenzelektronen, die sich in zwei unterschiedlichen Energieniveaus befinden ( $2s^2$ ,  $2p^1$ ).

Vereinfacht dargestellt entstehen durch  $sp^2$ -Hybridisierung drei energetisch gleichartige, mit jeweils einem Elektron besetzte Hybridorbitale, die die Trivalenz des Atoms ausmachen und die Bildung kovalenter Bor(III)-Verbindungen ermöglichen. Auf Grund des Elektronenmangels im unbesetzten  $2p_z$ -Orbital stellen Bor(III)-Verbindungen Lewis-Säuren dar und können tetrakoordinative,  $sp^3$ -hybridisierte Borverbindungen durch Liganden mit freien Elektronenpaaren bilden.<sup>92</sup>

Von Bor sind zwei natürliche, stabile Isotope bekannt, von denen  $^{11}\text{B}$  zu 80.4% und  $^{10}\text{B}$  zu 19.6% vorkommt. Moleküle, die das  $^{10}\text{B}$ -Isotop in hoher Konzentration enthalten, können in der *Boron-Neutron-Capture-Therapy* (BNCT) zur Tumorbekämpfung eingesetzt werden. Die Synthese borhaltiger Verbindungen mit biochemischer Affinität zu spezifischen Strukturelementen von Tumorzellen ist daher von besonderer Bedeutung bei der Erforschung von Tumortheraeutika.<sup>93</sup>

Tetrakoordinierte Borverbindungen, die einen borhaltigen Heterozyklus ausbilden, der in ein genügend großes konjugiertes Doppelbindungssystem integriert ist, können zur Fluoreszenz angeregt werden. In diesem Zusammenhang sind vor allem die ausführlich erforschten, als Fluoreszenzmarker eingesetzten 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-Derivate (**14**) bekannt (Abb. 3-7). Sie werden auf Grund ihrer Bor-Dipyrrromethen-Struktur als BODIPYs bezeichnet.<sup>72</sup>

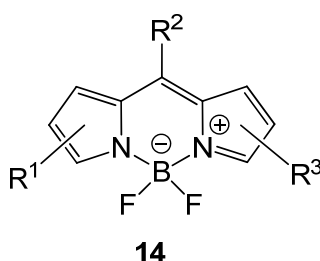


Abbildung 3-7: Allgemeine Struktur der BODIPYs **14**

Das Anbinden von Fluoreszenzmarkern an biologisch aktive Substanzen ermöglicht deren fluorimetrische Detektion, wobei allerdings die substanzspezifischen biochemischen Eigenschaften verändert werden. Wirkstoffmoleküle, die zur Eigenfluoreszenz angeregt werden können, weisen diesen Nachteil nicht auf, da sie direkt ohne weitere chemische Veränderung fluorimetrisch detektiert werden können.

Fluoreszierende Borverbindungen basierend auf der Benz- oder Pyridoazepinon-Struktur bekannter Proteinkinase-Inhibitoren sollten entwickelt werden. Die geplanten Verbindungen basieren auf der chelatartigen Einbindung einer Borgruppe in einen

ungesättigten Heterozyklus, der an das 1-Benzazepinon **24a** *d*-anelliert ist oder eine Verknüpfung mit dem Pyridin-Stickstoff des Pyrido[3,2-*b*]azepinons **24b** aufweist. Basierend auf den von Dunkel<sup>94</sup> synthetisierten 4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionen (**54**) sollten Difluoro-, Diphenyl- und Dialkoxyborverbindungen dargestellt werden (Abb. 3-8). Außerdem wurde die Synthese chelatartiger Difluorobor-komplexe des 1-Azapauillons **50** sowie des 1-Azahydrazons **51** angestrebt.

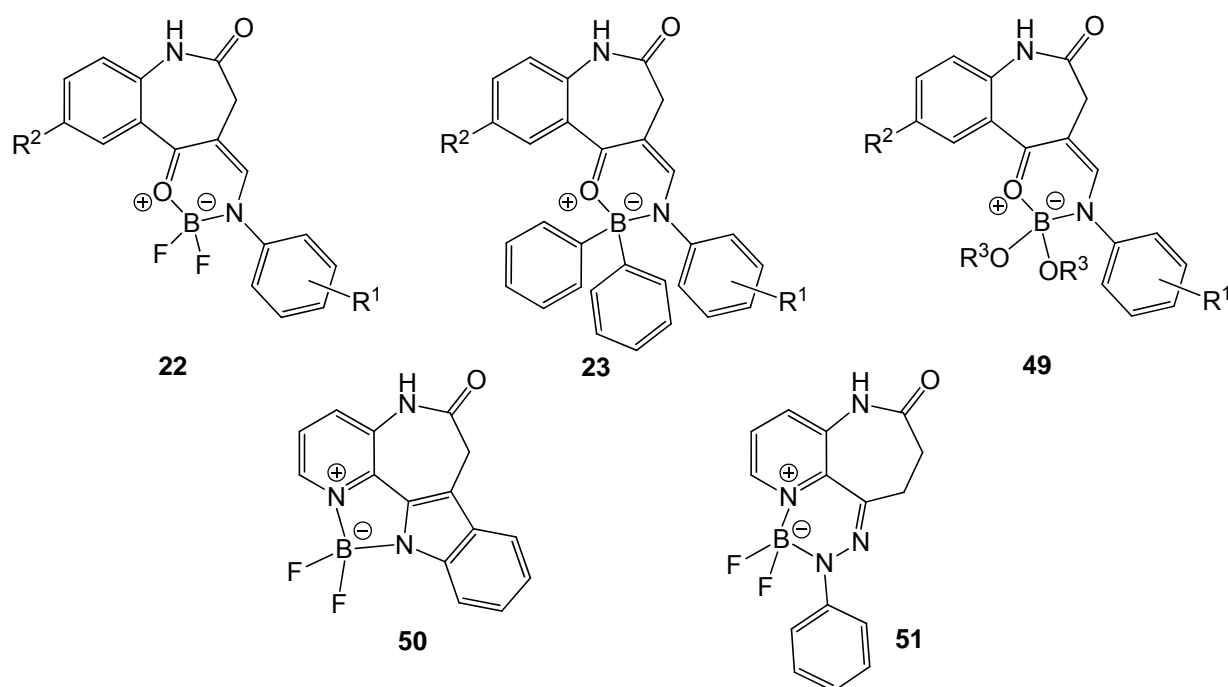
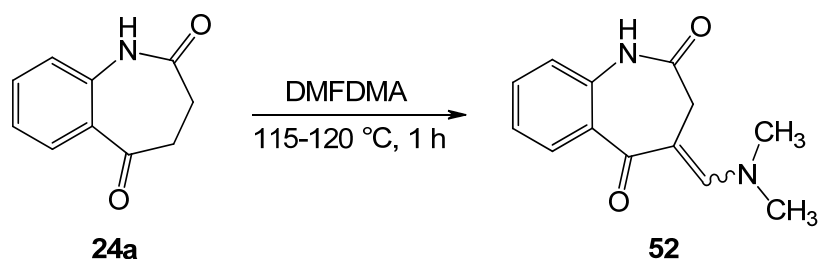


Abbildung 3-8: Strukturen der geplanten Borkomplexe **22**, **23** und **49-51**

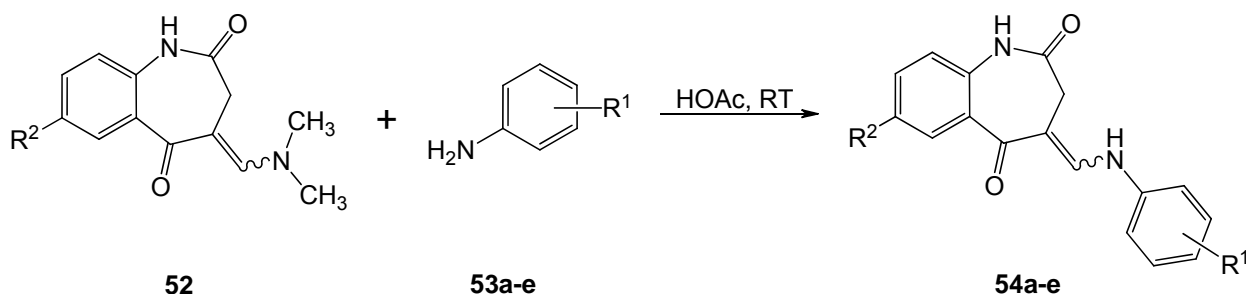
### 3.4.2 Synthese der 4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dione (**54**)

Nach Dunkel<sup>94</sup> wurde das 1-Benzazepinon **24a** durch einstündiges Erhitzen in *N,N*-Dimethylformamidmethylacetal zum Enaminon **52** umgesetzt (Schema 3-24).



Schema 3-24: Darstellung des 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dions (**52**)

Aus **52** wurden die 4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dione **54a-e** durch Umsetzung mit den primären aromatischen Aminen **53a-e** bei Raumtemperatur in Eisessig erhalten (Schema 3-25).



**Schema 3-25:** Darstellung der 4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dione **54a-e**

Die Art und Position des Substituenten (R<sup>1</sup>) der Verbindungen **54a-e**, die am Benzazepinonrest unsubstituiert sind (R<sup>2</sup> = H), sowie der entsprechenden Anilinderivate **53a-e** sind in Tabelle 3-3 dargestellt.

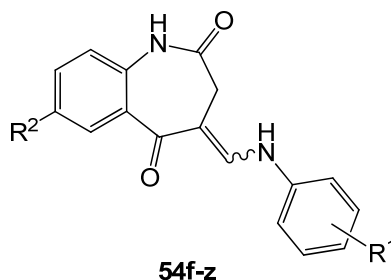
**Tabelle 3-3:** Edukte **53** und Enaminone **54** sowie die Reaktionsdauer [h]

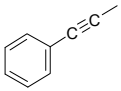
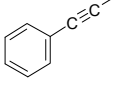
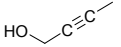
<b>53 sowie 54</b>	<b>R<sup>1</sup> (R<sup>2</sup> = H)</b>	<b>Reaktionsdauer [h]</b>
<b>a</b>	H	21
<b>b</b>	4-CF <sub>3</sub>	24
<b>c</b>	4-NO <sub>2</sub>	79
<b>d</b>	2-Br	72
<b>e</b>	2-COOH, 4-I	105

Die im Folgenden beschriebenen weiteren 4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dione **54f-z** wurden von Dunkel<sup>94</sup> erhalten und ohne weitere Aufarbeitung verwendet (Tab. 3-4).



**Tabelle 3-4:** Substituenten R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> der eingesetzten 4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dione **54f-z**



<b>54</b>	<b>R<sup>1</sup></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>54</b>	<b>R<sup>1</sup></b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>f</b>	4-Br	H	<b>r</b>	2-CH <sub>3</sub>	H
<b>g</b>	4-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	<b>s</b>	2-OCH <sub>3</sub>	H
<b>h</b>	4-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	<b>t</b>	2-OH	H
<b>i</b>	2-Cl	H	<b>u</b>	2-OCH <sub>3</sub>	I
<b>j</b>	4-I	H	<b>v</b>	2-Cl	I
<b>k</b>	4-CH <sub>3</sub>	H	<b>w</b>	4-CH <sub>3</sub>	I
<b>l</b>	4-OCH <sub>3</sub>	H	<b>x</b>	2-Cl	
<b>m</b>	3,5-Cl	H	<b>y</b>	4-CH <sub>3</sub>	
<b>n</b>	3-OCH <sub>3</sub>	H	<b>z</b>	3,5-Cl	
<b>o</b>	3-OH	H			
<b>p</b>	2-CH <sub>2</sub> OH	H			
<b>q</b>	2-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H			

### 3.4.3 Darstellung der Difluoroborkkomplexe **22**

Eine Vielzahl chelatartiger Borkomplexe ist bekannt, in denen das Boratom mit einem Chelatliganden einen Heterozyklus bildet. Zur Ausbildung eines tetrakoordinierten Boratoms können Liganden wie Halogen-, Alkoxy- und Aryl- sowie gesättigte und ungesättigte Alkylreste gebunden sein.

Viele dieser Borkomplexe binden die BR<sub>2</sub>-Gruppe über einen N,N- oder O,O-Chelatbildner in einen Heterozyklus ein. Als Beispiel für die durch zwei Stickstoffatome ermöglichten Bindungen zum Bor dienen die BODIPY-Strukturen **14**, dagegen ist unter anderem bei 1,3,2-(2*H*)-Dioxaborinen **55** ein Chelatbildner mit zwei Sauerstoffatomen vorhanden (Abb. 3-9).<sup>95-96</sup>

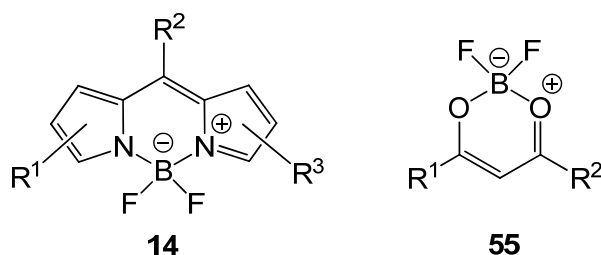
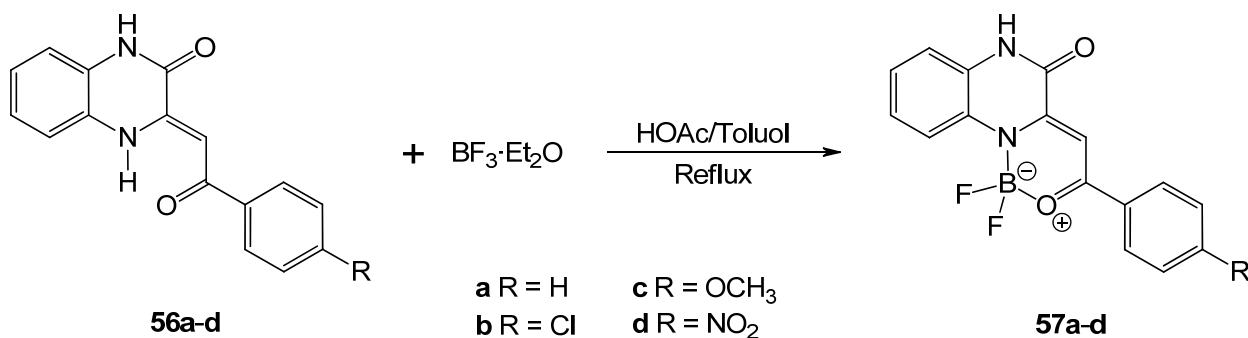


Abbildung 3-9: Struktur der BODIPYs **14** und der 1,3,2-(2H)-Dioxaborine **55**

Seltener sind Strukturen beschrieben, die N,O-Chelatkomplexe mit Bor ausbilden. Xia et al.<sup>74</sup> synthetisierten aus 3-(2-Oxo-2-arylethyliden)-3,4-dihydro-2(1H)-chinoxalinonen **56** mit der fünffach molaren Konzentration an Bortrifluorid-Etherat die Borkomplexe **57** dieser 1,3-Enaminoketone (Schema 3-26). Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus Essigsäure und Toluol eingesetzt, vermutlich um einen Unterschied in der Löslichkeit des Eduktes und des Produktes zu gewährleisten.

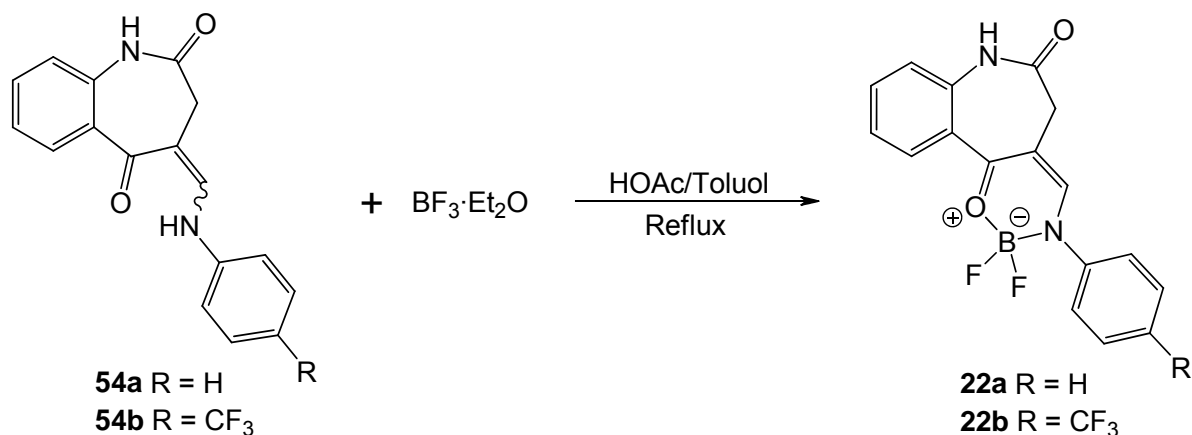


Schema 3-26: Synthese der Borkomplexe **57** nach Xia et al.<sup>74</sup>

Ausgehend von den 4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dionen **54** sollten zunächst Difluoroborkomplexe dargestellt werden, deren Fluorliganden anschließend gegen Phenyl- und Alkoxygruppen ausgetauscht werden sollten.

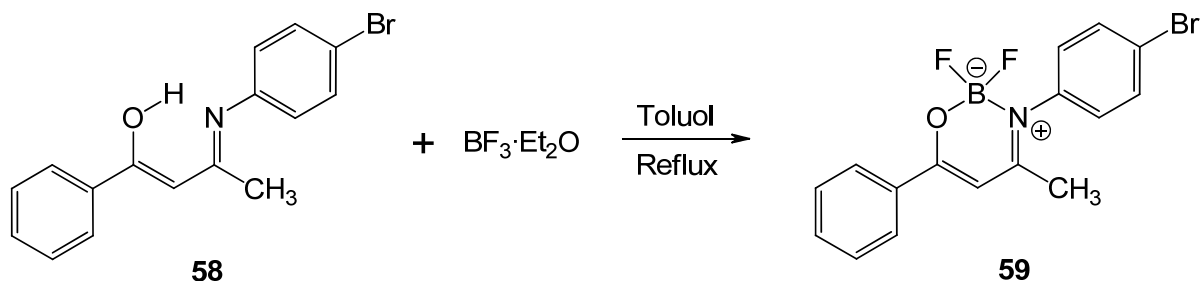
Eine Übertragung der Reaktionsbedingungen nach Xia et al. auf die Umsetzung der 4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dione **54a** und **54b** mit Bortrifluorid-Etherat führte zu einer partiellen Entstehung der Produkte **22a** und **22b** (Schema 3-27). Der Reaktionsablauf konnte nur unzureichend verfolgt werden, da trotz der Überprüfung zahlreicher Fließmittel kein genügender Unterschied der Retention von Edukt und Produkt in DC-Kontrollen erreicht werden konnte. Da die Borkomplexe **22a** und **22b** im sauren Lösungsmittel nicht wie die Verbindungen **57** in der Kälte präzipitierten, wurde der Reaktionsansatz mit fünfprozentiger Natriumacetat-Lösung

neutralisiert. Ein isolierter Niederschlag enthielt das jeweilige Produkt **22** im Gemisch mit dem entsprechenden Edukt **54**, welches nicht abgetrennt werden konnte.



**Schema 3-27:** Angestrebte Darstellung der Difluoroborkomplexe **22a** und **22b**

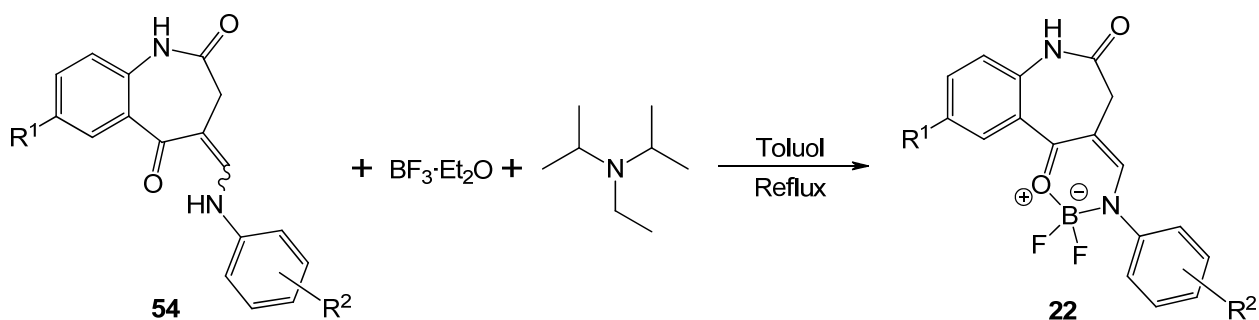
Nach Macedo et al.<sup>97</sup> wurden  $\beta$ -Diketon-,  $\beta$ -Ketoimin- und  $\beta$ -Diiminkomplexe mit Bortrifluorid-Etherat synthetisiert, deren Darstellung exemplarisch für den  $\beta$ -Ketoiminkomplex **59** abgebildet ist (Schema 3-28). In Toluol als Lösungsmittel wurde das Edukt **58** mit Bortrifluorid-Etherat äquimolar für 12 h refluxiert.



**Schema 3-28:** Darstellung des  $\beta$ -Ketoiminkomplexes **59** nach Macedo et al.<sup>97</sup>

Weitere Autoren beschreiben dagegen bei der Synthese von Difluoroborkomplexen den Zusatz Stickstoff-haltiger Basen wie Triethylamin, Ethyldiisopropylamin oder 2,4,6-Collidin zur Neutralisation des entstandenen Fluorwasserstoffs.<sup>72,98-99</sup> Durch die Entfernung dieser Säure sollte das Reaktionsgleichgewicht weiter auf die Seite der Produkte verschoben und eine vollständige Umsetzung der Edukte gewährleistet sein.

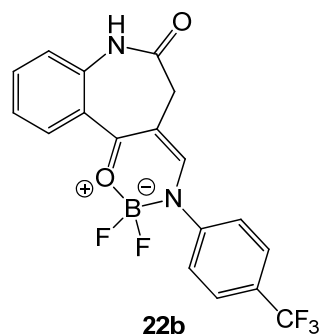
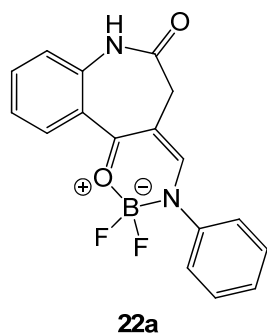
Die Synthese von **22** wurde daher nach Zhou et al.<sup>99</sup> in Toluol unter äquimolarem Zusatz von Ethyldiisopropylamin als Base durchgeführt (Schema 3-29), wobei im Gegensatz zur Originalvorschrift nicht bei 60 °C gearbeitet, sondern nach Macedo et al. zum Reflux erhitzt wurde.



**Schema 3-29:** Synthese der Difluoro- $\{ (4Z)\text{-}4\text{-}[(\text{phenylamino-}\kappa N)\text{methyliden}]\text{-}3,4\text{-dihydro-}1H\text{-}1\text{-benzazepin-}2,5\text{-dionato-}\kappa O^5\}\text{-bor-Derivate 22}$  (Für  $R^1$  und  $R^2$  vgl. Tab. 3-3 und 3-4)

Zur Ermittlung einer optimalen Reaktionsdauer wurden die Modellreaktionen zur Darstellung von **22a** und **22b** durch HPLC überwacht (Tab. 3-5), da aus den oben genannten Gründen eine dünnschichtchromatographisch-analytische Kontrolle keine befriedigenden Resultate ergab.

**Tabelle 3-5:** Prozentualer Anteil der Produkte **22a** und **22b** zu festgelegten Zeitpunkten der Umsetzung gemäß Schema 3-29<sup>a</sup>



Reaktionsdauer	Produktanteil <sup>b</sup>
5 min	74.8%
15 min	86.0%
30 min	87.3%
45 min	92.0%
60 min	98.1%
90 min	98.3%

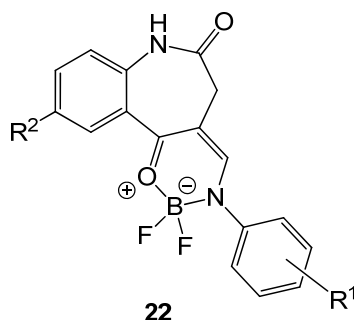
Reaktionsdauer	Produktanteil <sup>b</sup>
5 min	82.7%
15 min	83.5%
30 min	98.9%
45 min	98.7%
60 min	99.0%
90 min	98.9%

<sup>a</sup> Reaktionsbedingungen: Refluxieren äquimolarer Konzentrationen des Enaminons **54a** bzw. **54b** und Ethyldiisopropylamin in Toluol mit fünf Äquivalenten Bortrifluorid-Etherat

<sup>b</sup> Bestimmt durch HPLC, AUC 100%-Methode

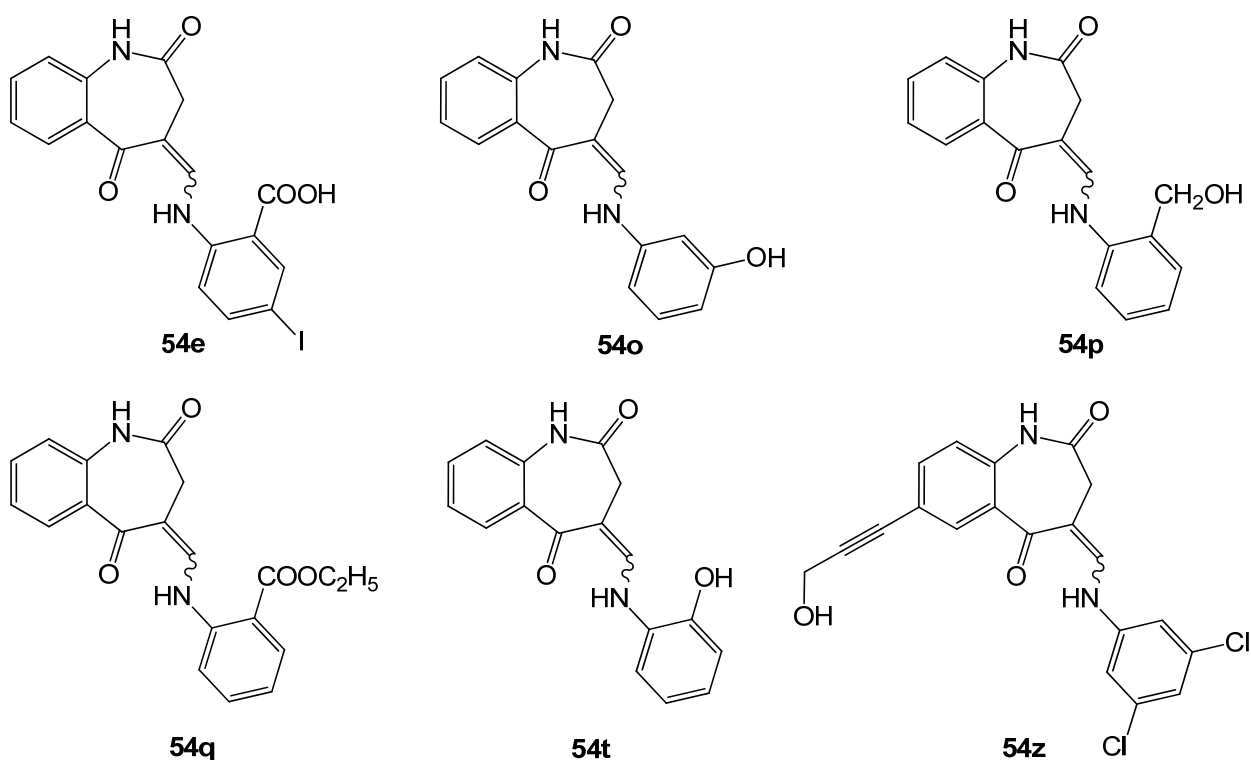
Die fast vollständige (> 98%) Umsetzung zum Produkt **22a** konnte nach einer Stunde sowie zum Produkt **22b** nach 30 Minuten festgestellt werden, wobei zu diesem Zeitpunkt jeweils keine weiteren Substanzen durch HPLC im Reaktionsansatz detektiert werden konnten. Mit Hilfe der so entwickelten Methode wurden die in Tabelle 3-6 aufgeführten Borkomplexe **22** dargestellt.

Tabelle 3-6: Dargestellte Derivate **22** und Reaktionszeiten



Verbindungen <b>22</b>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Reaktionsdauer
<b>a</b>	H	H	1.5 h
<b>b</b>	4-CF <sub>3</sub>	H	1.0 h
<b>c</b>	4-NO <sub>2</sub>	H	12.0 h
<b>d</b>	2-Br	H	6.0 h
<b>f</b>	4-Br	H	0.75 h
<b>g</b>	4-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	1.0 h
<b>h</b>	4-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	2.0 h
<b>i</b>	2-Cl	H	4.5 h
<b>j</b>	4-I	H	3.5 h
<b>k</b>	4-CH <sub>3</sub>	H	1.0 h
<b>l</b>	4-OCH <sub>3</sub>	H	1.0 h
<b>m</b>	3,5-di-Cl	H	1.5 h
<b>n</b>	3-OCH <sub>3</sub>	H	1.0 h
<b>r</b>	2-CH <sub>3</sub>	H	4.5 h
<b>s</b>	2-OCH <sub>3</sub>	H	4.5 h
<b>u</b>	2-OCH <sub>3</sub>	I	4.0 h
<b>v</b>	2-Cl	I	3.0 h
<b>w</b>	4-CH <sub>3</sub>	I	7.0 h
<b>x</b>	2-Cl		23.0 h
<b>y</b>	4-CH <sub>3</sub>		2.0 h

Bei der Umsetzung der Edukte **54e**, **54o-q** sowie **54t** und **54z** konnte während der Reaktion dünnschichtchromatographisch jeweils mindestens ein Nebenprodukt detektiert werden. Außerdem war in diesen Fällen eine Isolierung des angestrebten, reinen Produktes nicht erfolgreich. Diese Beobachtung kann mit der Anwesenheit funktioneller Gruppen in den jeweiligen Edukten erklärt werden, die wie die Bestandteile der Enaminon-Substruktur mit Bortrifluorid reagieren können (Abb. 3-10).



**Abbildung 3-10:** Enaminone **54**, die mit Bortrifluorid-Etherat keine einheitlichen Produkte ergaben

### 3.4.4 Besonderheiten der Analytik der Difluoroborkomplexe **22**

#### 3.4.4.1 NMR-spektroskopische Ergebnisse

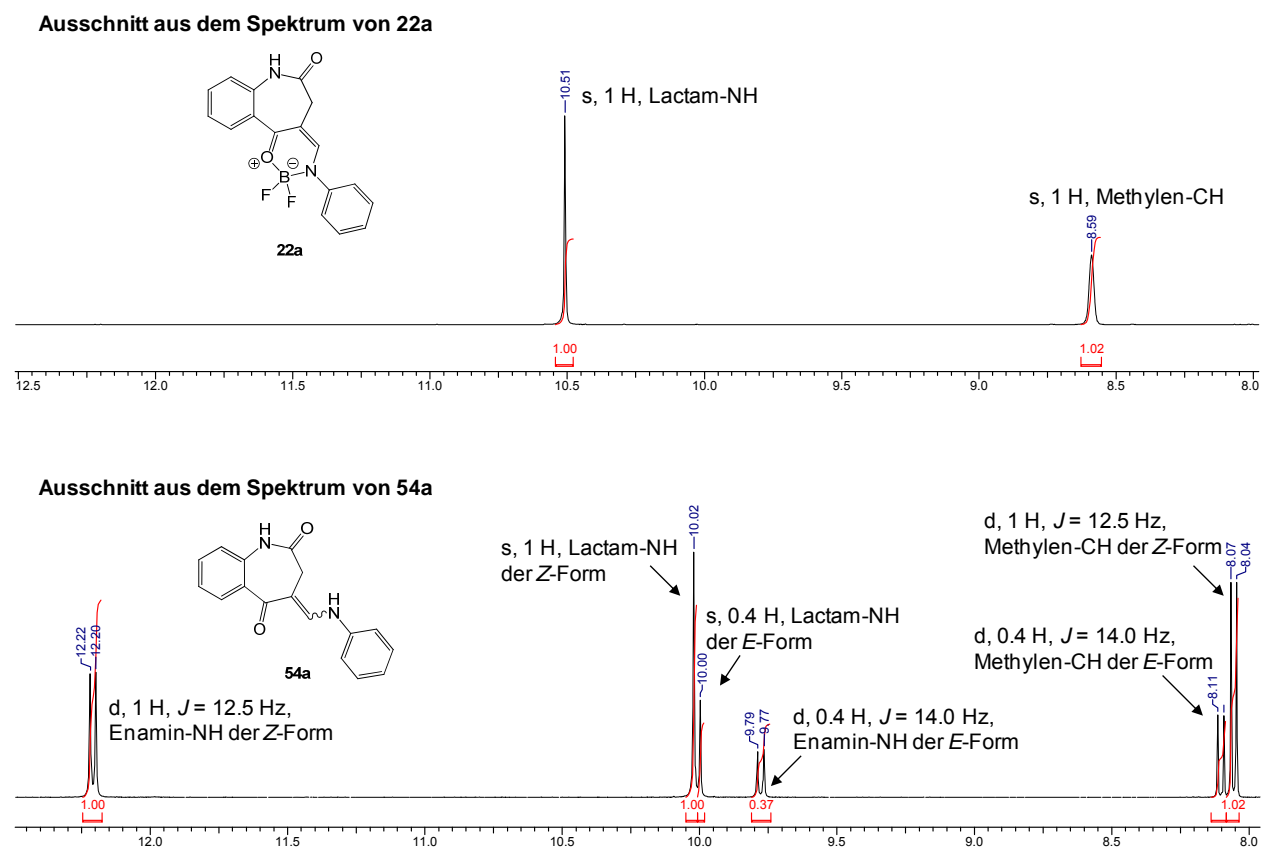
Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der unsubstituierten Difluoroborverbindung **22a** fehlt im Vergleich zum Spektrum des verwandten Enaminons **54a** das am weitesten tieffeldverschobene Signal, welches dem Proton am Enamin-Stickstoffatom zugeordnet wird.

Auf Grund der Delokalisation der positiven Ladung im Chelatring wird die  $\pi$ -Elektronendichte am Methylen-Proton der Enamin-Struktur verringert. Diese Abnahme der Elektronendichte verursacht eine geringere Abschirmung des Methylen-Protons und eine Tieffeldverschiebung des Signals. Es befindet sich bei  $\delta_{\text{H}} = 8.59$  ppm im Gegen-

satz zum äquivalenten Signal des *Z*- ( $\delta_{\text{H}} = 8.04$  ppm) oder des *E*-Isomers ( $\delta_{\text{H}} = 8.11$  ppm) des Enaminons **54a** (Abb. 3-11).<sup>94</sup>

Auch das Proton des Lactam-Stickstoffs sowie alle aromatischen Protonen des Difluoroborkomplexes zeigen um ca. 0.1 bis 0.5 ppm tieffeldverschobene Signale im Vergleich zu den Signalen des Liganden.

Sowohl beim Edukt als auch beim Produkt ist für die benzazepinische Methylen-Gruppe nur ein Singulett zu erkennen, welches im Fall von **22a** im Vergleich zum *Z*-Isomer des Eduktes ebenfalls eine geringe Tieffeldverschiebung zeigt. Das Auftreten eines Singulett spricht für die chemische Äquivalenz der Methylen-Protonen durch schnelle Ringinversion des gewinkelten Siebenringes.



**Abbildung 3-11:** Ausschnitt aus den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von **22a** und **54a**

Durch ein  $^{11}\text{B}$ - und ein  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum sollte das Vorliegen des Difluoroborstrukturelements veranschaulicht und Aussagen zur Koordination des Boratoms ermöglicht werden.

Beide natürlich vorkommenden Isotope  $^{10}\text{B}$  und  $^{11}\text{B}$  sind NMR-aktiv mit einer Spinquantenzahl von  $I = 3$  bzw.  $I = 3/2$ . Auf Grund der größeren natürlichen Häufigkeit

von 80.4% sowie einem fast dreifach größeren magnetogyrischen Verhältniss werden die  $^{11}\text{B}$ -Kerne NMR-spektroskopisch genutzt.<sup>100</sup> Die chemische Verschiebung des  $^{11}\text{B}$ -Signals lässt Aussagen zur Struktur des Moleküls zu und kann zusätzliche Informationen zur Verteilung von Valenzelektronen geben, da sie vom Hybridisierungszustand beeinflusst wird.

In trikoordinierten Borverbindungen ist das Boratom  $\text{sp}^2$ -hybridisiert, dabei liegt das  $\text{p}_z$ -Orbital des Boratoms als freies, unbesetztes Orbital vor. Dennoch nimmt es einen gewissen Raum ein, so dass die drei Bindungen bzw. die Valenzelektronen nicht symmetrisch um den Borkern verteilt sind. Die so verstärkte Abschirmung verursacht starke chemische Verschiebungen der Signale für die Borkerne (80 – 120 ppm).<sup>101</sup>

Die Orbitale des Boratoms in tetrakoordinierten Borverbindungen sind  $\text{sp}^3$ -hybridisiert und die entstehende symmetrisch-tetraedrische Anordnung der Bindungselektronen führt zur Abschirmung des Borkerns. Daher sind in diesem Fall die chemischen Verschiebungen nur von den ab- oder entschirmenden Eigenschaften der Substituenten abhängig. Das Auftreten eines Signals nahe 0 ppm zur externen Referenz Bortrifluorid-Etherat, die ein tetravalentes Boratom aufweist, spricht somit für ein symmetrisches, tetrakoordiniertes Boratom.<sup>97</sup>

Macedo et al. beschreiben für sechsgliedrige Difluoroborkomplexe im  $^{11}\text{B}$ -NMR-Spektrum eine Aufspaltung des Signals für den Borkern in ein Triplett, solange die Fluoratome Äquivalenz aufweisen. Diese liegt vor, wenn die Fluoratome an planare Komplexringe gebunden sind oder in gewinkelten Strukturen durch schnelle Ringinversionen ineinander überführt werden können. Bei Inäquivalenz der Fluorsubstituenten wird das Bor-Signal dagegen in ein Dublett vom Dublett aufgespalten ( $J_{\text{B-F}} = \text{ca. } 9 \text{ Hz und } 20 \text{ Hz}$ ).<sup>97</sup>

Im vorliegenden  $^{11}\text{B}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **22a** zeigt sich ein breites Triplett bei  $\delta_{\text{B}} = 1.84 \text{ ppm}$  (Abb. 3-12), welches auch durch ein Dublett vom Dublett mit zwei ähnlichen Kopplungskonstanten entstanden sein kann. Daher ist nicht eindeutig bestimmbar, ob chemisch äquivalente Fluoratome vorliegen. Die geringe chemische Verschiebung des Signals im Vergleich zur Referenz weist auf ein tetrakoordiniertes, symmetrisch substituiertes Boratom hin.

Bei Äquivalenz der Fluoratome einer  $\text{BF}_2$ -Verbindung wird in einem  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum ein Signal für die Fluorkerne erwartet, welches zu einem Quartett aufspaltet. Der Grund für diese Aufspaltung liegt in der Spinquantenzahl  $I = 3/2$  für den Kern des  $^{11}\text{B}$  im Gegensatz zu einem Wert von  $I = 1/2$  für Wasserstoff- ( $^1\text{H}$ ), Kohlenstoff- ( $^{13}\text{C}$ ) und Fluor-



kerne ( $^{19}\text{F}$ ). Nach der Multiplizitätsregel<sup>100</sup>  $2 \cdot I \cdot n + 1$ , in der  $I$  die Spinquantenzahl und  $n$  die Anzahl der koppelnden Kerne beschreibt, ergibt sich der Wert 4 und ein Quartett als Aufspaltungsmuster. Zeigen die Fluoratome keine Äquivalenz, so entsteht für jeden Fluorkern ein Dublett vom Quartett, da zum einen die Kopplung mit dem Borkern, zum anderen eine Kopplung mit dem zweiten Fluorkern auftritt. Die in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Difluoroborkkomplexe **57** weisen nach Xia et al.<sup>74</sup> eine chemische Verschiebung des Signals für die Fluorkerne von  $\delta_{\text{F}} = -122$  bis  $-123$  ppm auf, die Borkomplexe der Ketoiminate **59** zeigen laut Marcedo et al.<sup>97</sup> Resonanz bei einer Frequenz von  $\delta_{\text{F}} = -135$  ppm.

Im  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **22a** wird nur eine einzelne Signalgruppe bei  $\delta_{\text{F}} = -129.80$  bis  $-129.88$  ppm detektiert (Abb. 3-12). Es ist möglich, dass es sich um ein Signal höherer Ordnung handelt, das von zwei chemisch nicht äquivalenten Fluoratomen mit vergleichbaren chemischen Verschiebungswerten hervorgerufen wird. Da das Molekül **22a** weder im Benzazepinring noch im Borheterozyklus (vgl. Kapitel 3.4.4.2) Planarität aufweist, kommt eine Inäquivalenz der Fluoratome zustande, wenn ihr Austausch langsam im Vergleich zur Zeitskala des  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrums erfolgt. Allerdings beschreiben Macedo et al.<sup>97</sup> für ähnliche Borverbindungen **59** mit inäquivalenten Fluoratomen eine Konstante von  $J_{\text{F-F}} = 90$  Hz für die geminale Kopplung. Im hier auftretenden Signal kann eine maximale Kopplungskonstante von ca. 30 Hz bestimmt werden, die eine Deutung zugunsten äquivalenter Fluoratome zulässt.

Insgesamt kann das breite Signal dadurch zustande kommen, dass die Fluoratome zwar gegeneinander ausgetauscht werden, dieses aber bei Raumtemperatur so langsam geschieht, dass Koaleszenz beider möglicher Signalsätze auftritt.

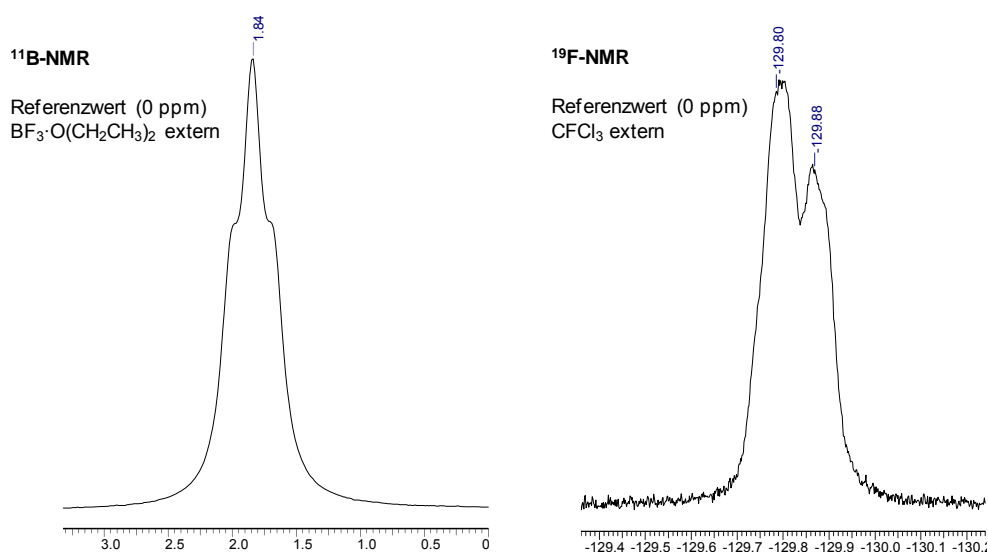


Abbildung 3-12: Signale des  $^{11}\text{B}$ - und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrums von **22a**

#### 3.4.4.2 Röntgenkristallstruktur der Difluorborverbindung **22a**

Die  $^1\text{H}$ -,  $^{11}\text{B}$ - und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Untersuchungen lassen auf ein tetrakoordiniertes Boratom schließen, wobei eine chemische Äquivalenz der Fluoratome nicht abschließend geklärt werden konnte. Diese Ergebnisse wurden von Molekülen in Lösung erhalten. Zur Untersuchung des genauen räumlichen Aufbaus eines Kristalls wurde exemplarisch eine Röntgenkristallstruktur der Verbindung **22a** angefertigt (Abb. 3-13). Vermessen wurde der Kristall bei einer Temperatur von 100 K. Die dreidimensionalen Atomkoordinaten wurden aus den detektierten Röntgenstrahlen berechnet, die an den Elektronen der Atome im Einkristall gebeugt wurden.<sup>102</sup>

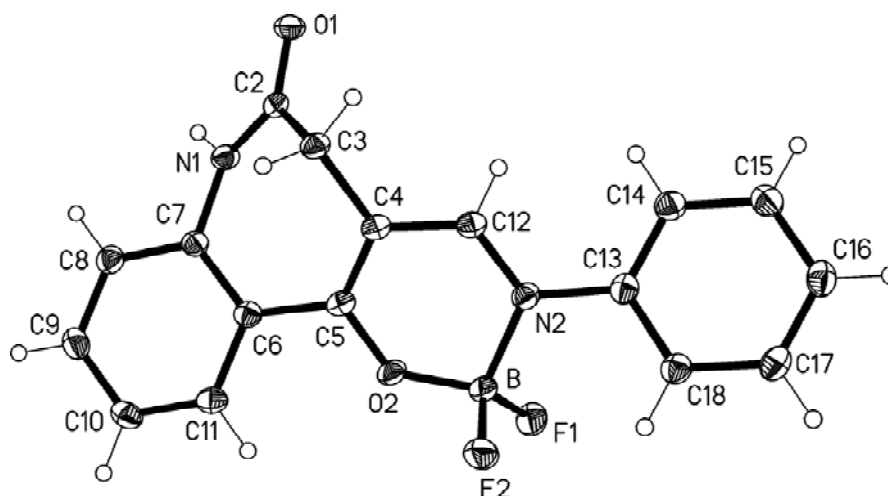


Abbildung 3-13: Röntgenkristallstruktur der Verbindung **22a**

Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

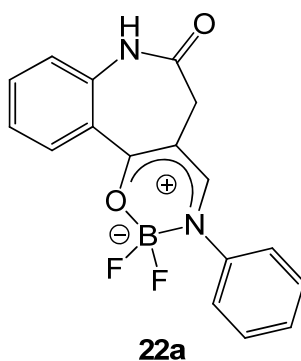
Unter besonderer Betrachtung des Heterozyklus' um das Boratom werden die ermittelten Bindungslängen und -winkel mit Standardwerten sowie Bindungslängen anderer N,O-Borchelatkomplexe verglichen. Die zugehörigen Bindungslängen und -winkel sind in Tabelle 3-7 aufgeführt.

**Tabelle 3-7:** Bindungslängen und -winkel der Kristallstruktur **22a**

Bindungslängen [Å]		Bindungswinkel [°]		Torsionswinkel [°]	
B-F(1)	1.3763(15)	F(1)-B-F(2)	111.52(10)	C(12)-C(4)-C(5)-O(2)	1.83(16)
B-F(2)	1.3836(15)	F(1)-B-O(2)	108.52(10)	C(4)-C(5)-O(2)-B	14.11(16)
O(2)-B	1.4664(15)	F(2)-B-O(2)	108.87(10)	C(5)-O(2)-B-N(2)	-21.99(15)
N(2)-B	1.5762(15)	F(1)-B-N(2)	109.23(9)	C(12)-N(2)-B-O(2)	16.41(14)
C(12)-N(2)	1.3196(14)	F(2)-B-N(2)	109.60(9)	C(4)-C(12)-N(2)-B	-3.80(16)
C(5)-O(2)	1.3181(13)	O(2)-B-N(2)	109.05(9)	C(5)-C(4)-C(12)-N(2)	-6.46(16)
C(4)-C(12)	1.4078(15)				
C(4)-C(5)	1.3835(15)				

Die Bindungslängen von C4-C5 (1.3835 Å) und C4-C12 (1.4078 Å) liegen nahe dem Mittelwert der Standardbindungen einfacher C-C- (1.54 Å) und doppelter C=C- (1.34 Å) Bindungen. Sie ähneln damit der Länge aromatischer Kohlenstoffbindungen mit 1.40 Å. Ebenso entspricht die gefundene Bindungslänge von C5-O2 (1.3181 Å) einem Mittelwert von C-O (1.43 Å) und C=O (1.20 Å) und die Länge der Bindung C12-N2 (1.3196 Å) ist zwischen C-N (1.47 Å) und C=N (1.28 Å) anzuordnen. Daraus folgt das Vorliegen einer Elektronendelokalisation im Chelatring<sup>74</sup> und eine Verteilung der aus der Bindung des Boratoms resultierenden positiven Ladung über die fünf Atome des Chelatliganden, die mit dem Boratom den Heterozyklus bilden (Abb. 3-14).

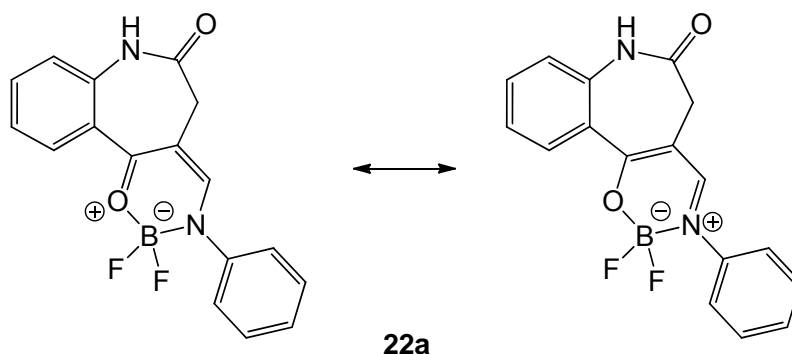
Ein Vergleich der gemessenen Bindungslängen mit den von Allen<sup>103</sup> ermittelten Längen, die den Einfluss weiterer Bindungspartner einbeziehen, bestätigt das Ergebnis einer starken Elektronendelokalisation.



**Abbildung 3-14:** Verteilung der positiven Ladung im Borchelatkomplex **22a**

Die N2-B-Bindung (1.5762 Å) ist wenig kürzer als die bei kovalenten N-B-Bindungen auftretende Länge von 1.61 Å, wohingegen die O2-B-Bindung (1.4664 Å) im Gegensatz zur gewöhnlichen kovalenten Bindung (O-B 1.34-1.40 Å) gestreckt ist.<sup>74</sup> Diese Ergebnisse stimmen mit den üblicher Weise bei N,O-Borchelatkomplexen gefundenen Bindungslängen für N-B (1.57 Å) und O-B (1.46 Å) überein.<sup>74,104-107</sup>

Die lange B-O-Bindung lässt auf eine koordinative Bindung schließen und die B-N-Bindung weist einen verstärkten kovalenten Charakter auf. Dennoch ermöglicht die Elektronendelokalisation im Chelatring keine feste Zuordnung der kovalenten und der koordinativen Bindung zum Sauerstoff O2 oder Stickstoff N2 des Chelatliganden. Insgesamt beschreiben diese Ergebnisse eine Resonanzstruktur des Chelatringes im festen Zustand, die durch Delokalisation der Elektronen ausgezeichnet wird und durch zwei mesomere Grenzstrukturen als Enaminoketon oder Enolimin dargestellt werden kann (Abb. 3-15).



**Abbildung 3-15:** Mesomere Grenzstrukturen der Verbindung **22a**

Die Struktur ähnelt dadurch stark dem intensiv erforschten Motiv der Resonanz-unterstützten Wasserstoffbrückenbindung (*resonance-assisted hydrogen bond*, RAHB).<sup>108-110</sup>

Beim intramolekular auftretenden RAHB-Effekt sind Wasserstoffdonor und -akzeptor über ein gekoppeltes  $\pi$ -Elektronensystem miteinander konjugiert und ein *quasi*-Ring wird durch die Wasserstoffbrücke ausgebildet. Dieser weist eine stärkere  $\pi$ -Elektronen-delokalisation auf als eine analoge Struktur ohne diese intramolekulare Wechselwirkung. Der vorliegende Zustand wird von Sobczyk et al.<sup>111</sup> als eine Kombination zweier tautomerer Formen beschrieben und als konjugierte Chelatverbindung bezeichnet.

Durch die unterschiedlichen Bindungslängen tritt im Kristall eine Verzerrung des sechsgliedrigen Heterozyklus' auf und das Boratom liegt nicht mittig zwischen Sauerstoff- und Stickstoffatom. Der zweizählige Ligand chelatisiert das Boratom mit einem Bindungswinkel von 109 °. Die übrigen Winkel zwischen zwei der Atome O2, N2, F1 und F2 und dem Boratom liegen ebenfalls im Bereich dieses Wertes und gleichen dadurch einem optimalen Tetraederwinkel von 109 °. Durch diese spitzen Winkel im Vergleich zu den Innenwinkeln eines gleichmäßigen Sechsecks wird die Verzerrung des Chelatringes unterstützt und eine stärkere Entfernung der Difluoroborgruppe vom Zentrum des Chelatzyklus' bewirkt.

Dabei sind die drei Kohlenstoffatome C5, C4 und C12 sowie das Stickstoffatom N2 nahezu planar angeordnet, wohingegen sich im Bereich des Bor- und Sauerstoffatoms Torsionswinkel bis 22 ° zeigen. Im kristallinen Zustand besteht daher keine Äquivalenz der Fluorsubstituenten, in Lösung ist dagegen der Austausch der Fluoratome denkbar.

#### 3.4.4.3 Massenspektroskopische Untersuchungen

Einige Verbindungen der Klasse **22** wurden zur vollständigen analytischen Charakterisierung massenspektroskopisch untersucht. Die Borkomplexe enthalten neben Reinelementen und Elementen mit einem stark überwiegenden Isotop das Element Bor, welches aus 19.6% des <sup>10</sup>Bor- und 80.4% des <sup>11</sup>Borisotops zusammengesetzt ist. Verbindungen, die ausschließlich aus Reinelementen und Elementen mit einem stark überwiegenden Isotop aufgebaut sind, erzeugen neben dem Peak des Hauptmolekülions nur sehr gering ausgeprägte, weitere Molekülionen-Signale im Massenspektrum, die von Molekülen mit seltenen Isotopen der Atome verursacht werden. Bei den Verbindungen **22** kommt es durch das Vorliegen von fast 20% an Molekülen mit <sup>10</sup>Borisotop zur Bildung von zwei stark ausgeprägten Molekülionen-Peaks. Beispielfhaft zeigt Abbildung 3-16 einen Ausschnitt des Massenspektrums der Verbindung **22j**.

Bei **22b**, **c**, **j** und **u** wurde jeweils der Molekülradikalkation-Peak ( $[M]^{+\cdot}$ ) des Moleküls mit  $^{10}\text{B}$ -Isotop hochaufgelöst. Es wurde somit das Signal vermessen, welches 0.9964 Masseneinheiten unterhalb der berechneten, exakten Masse (Molekülmasse aus der Präzisionsmassensumme der am häufigsten vorkommenden Isotope) liegt, da dieses der Massenunterschied zwischen dem  $^{11}\text{B}$ - und dem  $^{10}\text{B}$ -Isotop ist (Abb. 3-16). Bei **22w** und **y** wurde das Signal hochaufgelöst, welches zur Masse eines Moleküls mit  $^{10}\text{B}$ -Isotop abzüglich eines Wasserstoffatoms ( $[M-H]^{+\cdot}$ ) gehört.

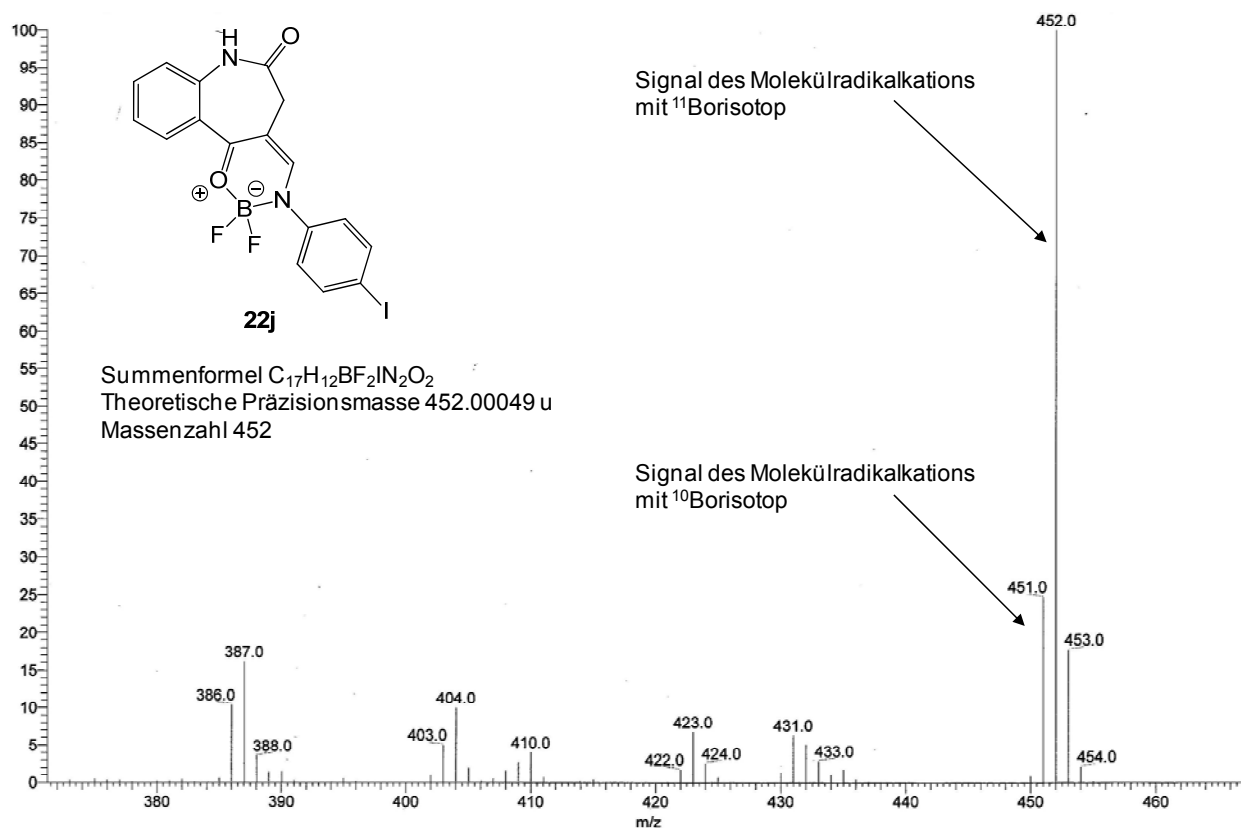


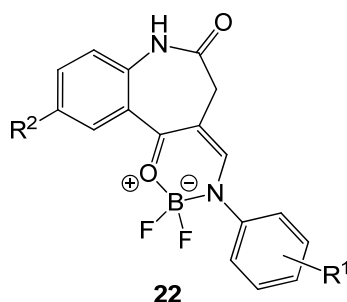
Abbildung 3-16: Ausschnitt des Massenspektrums der Verbindung **22j**

Die Moleküle wurden durch Elektronenstoß-Ionisation zu Kationen umgewandelt, um sie im Hochvakuum nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis zu trennen. Daher resultiert aus der hochaufgelösten Massenbestimmung die Masse für das Molekülradikalkation. Als zu erwartender, theoretischer Wert wird dagegen die exakte Masse des ungeladenen Moleküls berechnet. Die Masse eines Elektrons<sup>112</sup> mit  $m_e = 5.48 \cdot 10^{-4} \text{ u}$  wird nicht von dieser berechneten Masse abgezogen. Dennoch wird sie konventionsgemäß als  $[M]^{+\cdot}$  angegeben und die Massenveränderung durch Abspaltung des Elektrons vernachlässigt.

### 3.4.4.4 Stabilitätsdaten der Verbindungen 22

Im festen Zustand sind die Borverbindungen **22** bei Raumtemperatur und trockener Lagerung stabil. Durch das Erhitzen in polaren, protischen Lösungsmitteln kam es jedoch zur Rückbildung des jeweiligen Eduktes **54**. Bei einigen Verbindungen **22** wurde nach der Lösung in DMSO und Lagerung bei Raumtemperatur ebenfalls das Auftreten von Instabilität festgestellt. Da eine solche Unbeständigkeit die Durchführung und Auswertung biologischer Testungen der gelösten Substanz erschwert, wurden Stabilitätseigenschaften repräsentativer Verbindungen durch eine HPLC- und eine NMR-Untersuchung ermittelt. Tabelle 3-8 stellt den prozentualen Anteil der jeweiligen Substanz **22** in der Probe direkt nach der Lösung in DMSO, nach einer und nach vier Wochen dar.

**Tabelle 3-8:** Prozentuale Anteile<sup>a</sup> der Verbindungen **22** zu verschiedenen Zeitpunkten nach Lösung in DMSO



Substanzen <b>22</b>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	sofort	7 d <sup>b</sup>	28 d <sup>b</sup>
<b>a</b>	H	H	99.6%	99.5%	98.5%
<b>b</b>	4-CF <sub>3</sub>	H	95.2%	7.6%	0%
<b>c</b>	4-NO <sub>2</sub>	H	90.6%	11.0%	0%
<b>g</b>	4-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	97.2%	98.9%	97.4%
<b>h</b>	4-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	98.5%	96.0%	97.4%
<b>i</b>	2-Cl	H	95.7%	29.8%	13.0%
<b>j</b>	4-I	H	94.5%	91.7%	80.8%
<b>k</b>	4-CH <sub>3</sub>	H	99.5%	99.6%	99.4%
<b>l</b>	4-OCH <sub>3</sub>	H	97.9%	97.8%	96.8%
<b>m</b>	3,5-Cl	H	96.0%	35.4%	0%
<b>n</b>	3-OCH <sub>3</sub>	H	97.2%	97.6%	97.6%
<b>r</b>	2-CH <sub>3</sub>	H	99.1%	91.0%	78.2%
<b>s</b>	2-OCH <sub>3</sub>	H	99.0%	96.6%	98.7%
<b>u</b>	2-OCH <sub>3</sub>	I	96.4%	85.5%	82.9%

<sup>a</sup> Bestimmt durch HPLC, AUC 100%-Methode.

<sup>b</sup> d: Tage

Alle untersuchten Verbindungen **22** zeigten sofort nach der Lösung in DMSO einen prozentualen Anteil von > 94% bezogen auf sämtliche mittels UV-Detektor bei 254 nm nachweisbaren Substanzen. In den zeitnah ermittelten  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren zeigten sich keine unerwünschten Signale neben den erwarteten für die Protonen des zugehörigen Derivates. Eine Ausnahme bildet die 4-Nitroverbindung **22c**, welche auf Grund einer verzögerten HPLC-Untersuchung einen 90.6-prozentigen Substanzanteil ergab und zusätzliche Signale geringer Intensität im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum aufwies.

Unsubstituierte Verbindungen oder solche mit einem elektronenschiebenden Substituenten am *N*-Phenylrest sind in DMSO-Lösung stabil. Es kann vermutet werden, dass ein elektronenschiebender Rest die Elektronendichte sowie die Basizität des Stickstoffs im Enaminstrukturelement erhöht. Daraus folgt eine weniger polarisierte Bindung zum Boratom, die stabiler ist und weniger schnell gespalten werden kann. Eine Ausnahme stellt die in 2-Position des Phenylrestes methylierte Verbindung **22r** dar, die in DMSO-Lösung innerhalb von 4 Wochen eine Abnahme des Substanzanteils auf 78% zeigte.

Dagegen zersetzen sich in DMSO gelöste Verbindungen, deren Substituent am *N*-Phenylrest elektronenziehende Eigenschaften durch einen überwiegenden –I- oder einen kombinierten –I/–M-Effekt besitzt. Der Elektronenzug verringert in diesen Fällen die Basizität des Enamin-Stickstoffatoms. Dadurch wird die Bindung zum Bor stärker polarisiert und damit leichter nucleophil angreifbar. Bei jeder instabilen Verbindung **22** deutet das UV-Spektrum eines der durch die HPLC getrennten Zersetzungsprodukte auf die Entstehung des zugehörigen Eduktes **54** hin. Ein besonders starker Abbau des Difluoroborkomplexes zeigt sich bei den Verbindungen **22b**, **c** und **m** mit 4-Trifluormethyl-, 4-Nitro- bzw. 3,5-Dichlorsubstituenten, deren Lösungen nach 4 Wochen keine Ausgangssubstanz mittels HPLC detektieren ließen (Tab. 3-8). Durch die zugehörigen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren konnte nicht auf eventuelle Abbauprodukte geschlossen werden, da sich die Anzahl der Signale im aromatischen Bereich stark erhöht und sie zu einem sehr breiten Multiplett verschmelzen.

Die 4-Iodsubstitution des Phenylrestes zeigt im Gegensatz zur 2-Chlorsubstitution einen viel geringeren Abbau des Komplexes nach vier Wochen. Einfluss hierauf kann einerseits die Stellung des Substituenten sowie seine geringere Elektronegativität haben. Eine Iodsubstitution am Benzazepinring führt zu merklicher Instabilität des Komplexes wie der Vergleich der Verbindungen **22s** und **22u** deutlich macht (Tab. 3-8).



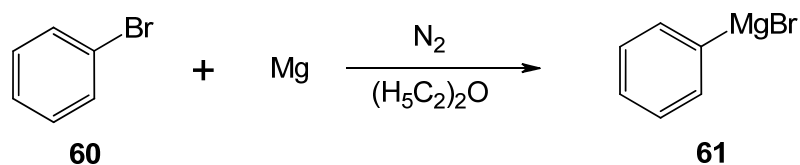
### 3.4.5 Darstellung der Diphenylborkomplexe **23**

Zur Weiterentwicklung der Klasse der Borkomplexe aus Enaminonen sollten die analogen Diphenylborkomplexe **23** dargestellt und hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden.

Veröffentlichungen von Goze<sup>113</sup> und Ulrich<sup>114</sup> beschreiben den Einsatz organometallischer Reagentien auf Basis von Magnesium oder Lithium zur Substitution der Fluorliganden in BODIPY-Derivaten. Durch die Umsetzung mit Alkyl- oder Aryllithium kam es zu einer schnell und heftig ablaufenden Disubstitution beider Fluor-Atome. Dagegen konnte durch Zugabe von Alkyl- oder Arylmagnesiumbromid in äquimolarer Konzentration in einer besser kontrollierbaren Reaktion bei 0 °C das einfachsubstituierte Monofluorderivat isoliert werden. Bei doppeltmolarer Konzentration des Grignard-Reagenzes und Raumtemperatur war das dialkylierte oder diarylierte Produkt erhältlich.

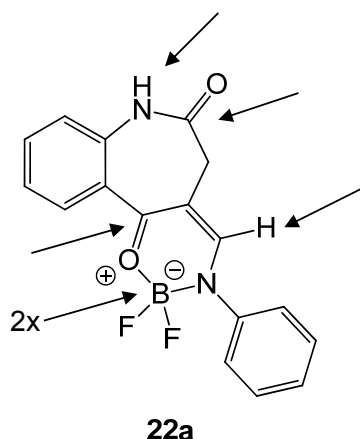
Eine solche Substitutionsreaktion sollte am Difluoroborkomplex **22a** durchgeführt werden und das {(4*Z*)-4-[(Phenylamino- $\kappa$ N)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-diphenylbor (**23a**) zugänglich machen.

Zunächst wurde nach einer allgemeinen Vorschrift<sup>115</sup> Phenylmagnesiumbromid (**61**) aus elementarem Magnesium und Brombenzol (**60**) hergestellt (Schema 3-30).



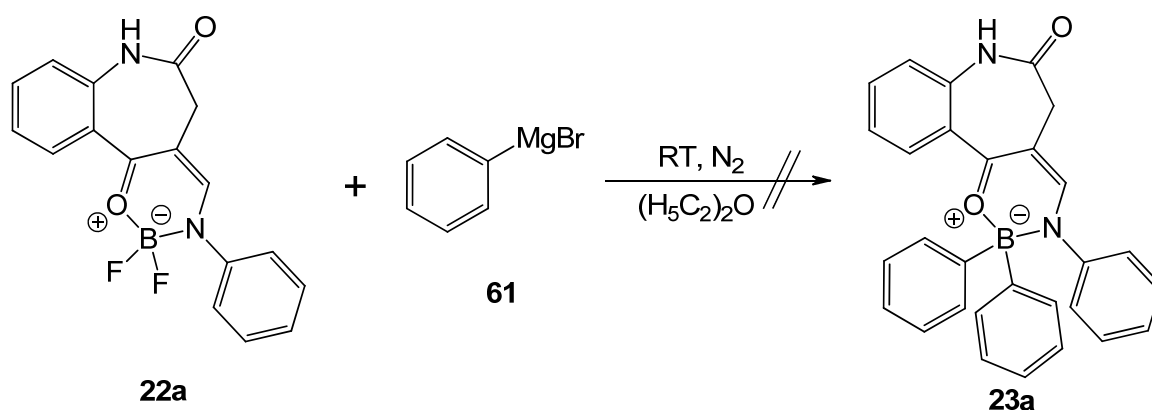
Schema 3-30: Darstellung des Phenylmagnesiumbromids (**61**)

Nach Ulrich<sup>114</sup> wurde anschließend **22a** mit Phenylmagnesiumbromid (**61**) in getrocknetem Diethylether bei Raumtemperatur umgesetzt. Durch das Vorhandensein azider Wasserstoffe sowie von Carbonylgruppen im Difluoroborkomplex **22a**, die das Reagenz zersetzen oder binden können, wurde die sechsfach molare Konzentration des Grignard-Reagenzes gewählt (Abb. 3-17).



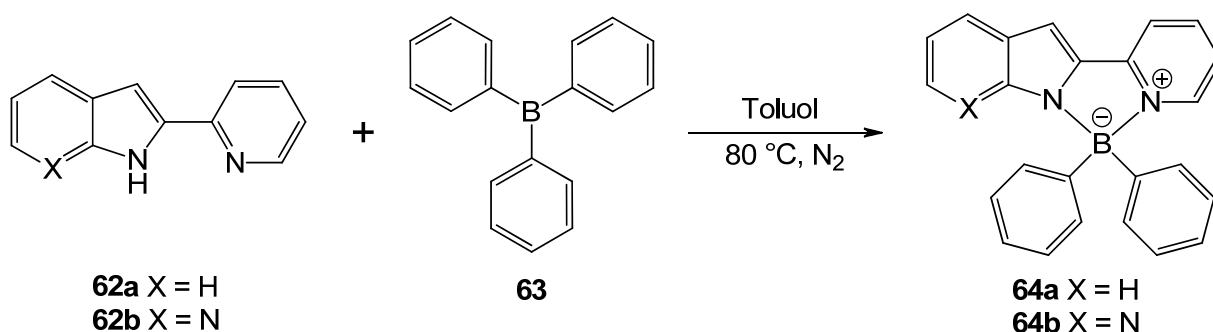
**Abbildung 3-17:** Mögliche Angriffsstellen des Grignard-Reagenzes

Nach der vollständigen Umsetzung des Eduktes **22a** konnten mehrere Produkte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie detektiert werden. Mit zehnpromzentiger Salzsäure wurde überschüssiges Phenylmagnesiumbromid (**61**) zersetzt und die organischen Substanzen mit Dichlormethan extrahiert. Nach dem Einengen der organischen Phase konnte das erwünschte Produkt nicht isoliert werden (Schema 3-31). Dieses kann auf die Bildung von Nebenprodukten durch die Vielzahl der möglichen Angriffsstellen für das Grignard-Reagenz zurückgeführt werden.



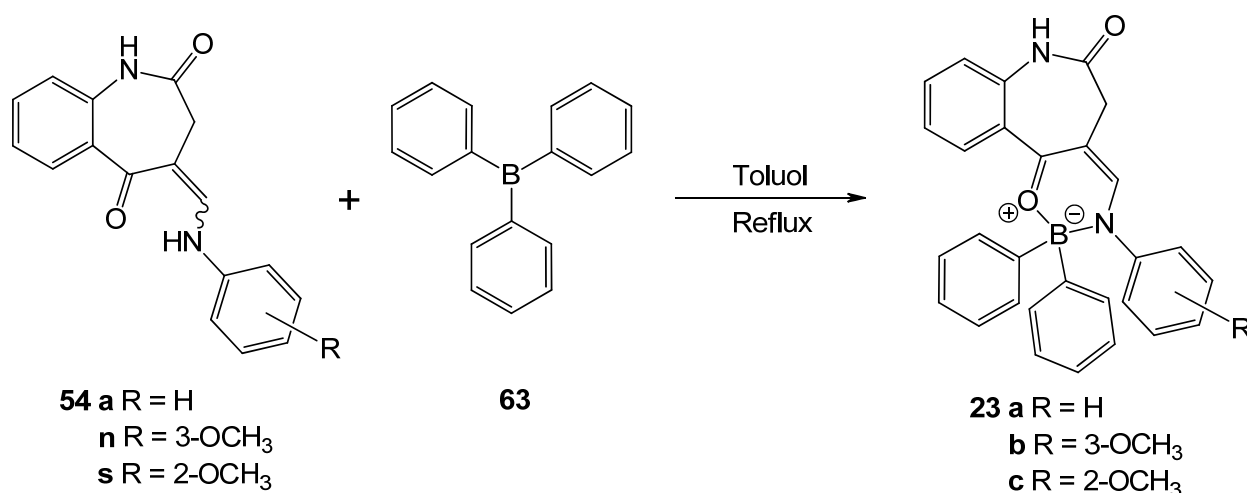
**Schema 3-31:** Angestrebte Synthese des {(4*Z*)-4-[(Phenylamino- $\kappa$ N)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-diphenylbors (**23a**)

Liu et al.<sup>116</sup> beschreiben die Umsetzung von 2-(2-Pyridyl)indol (**62a**) und 2-(2-Pyridyl)-7-azaindol (**62b**) mit Triphenylboran (**63**) zu fünfgliedrigen, zyklischen Diphenylborkomplexen **64** (Schema 3-32).



Schema 3-32: Synthese fünfgliedriger Diphenylborkomplexe **64** nach Liu et al.<sup>116</sup>

Analog zu dieser Vorschrift sollten die sechsgliedrigen Diphenylborchelatkomplexe **23** aus den entsprechenden 4-(Anilinomethyliden)benzazepin-2,5-dionen **54** synthetisiert werden. Es wurde bei  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in getrocknetem Toluol mit Triphenylboran (**63**) zunächst die am Chelatligand unsubstituierte Komplexverbindung **23a** dargestellt. Da sich bei dieser Temperatur das Enaminon **54a** nicht vollständig in die Verbindung **23a** überführen ließ, wurde nach einer Vorschrift von Liu et al.<sup>117</sup> sowie in Anlehnung an die Reaktionsbedingungen zur Synthese der beschriebenen Difluoroborkomplexe zum Reflux erhitzt (Schema 3-33). Durch Umkristallisation aus Aceton wurde das analysenreine Produkt **23a** erhalten. Auf diese Weise wurden auch das 3-Methoxy- und das 2-Methoxyderivat **23b** und **23c** hergestellt.

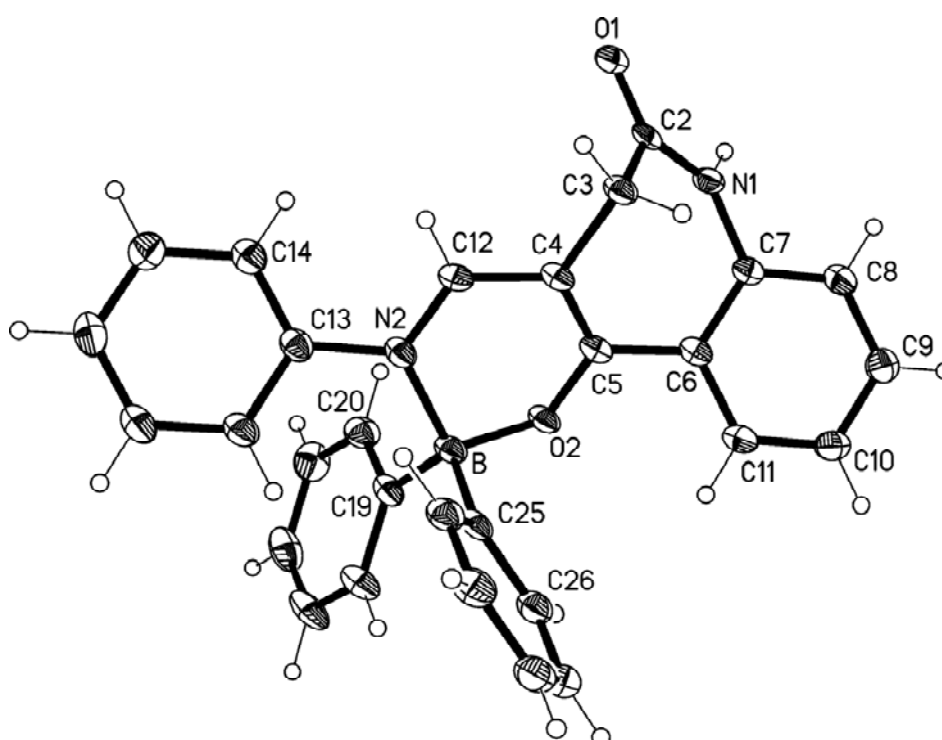


Schema 3-33: Darstellung der Diphenylborkomplexe **23a-c**

### 3.4.6 Besonderheiten der Analytik der Diphenylborkomplexe **23**

#### 3.4.6.1 Röntgenkristallstruktur der Diphenylborverbindung **23a**

Bei den Diphenylborkomplexen **23** handelt es sich um eine neue Klasse der Borkomplexe aus den Enaminonen **54**. Analog zu der Difluorborverbindung **22a** ist die Analyse der Elektronenverteilung und der Art der Borkoordination dieser Struktur von Interesse. Durch eine Röntgenkristallstrukturanalyse (Abb. 3-18) konnte die Struktur des Chelatringes sowie die Ausrichtung und der strukturelle Einfluss der Phenylreste beleuchtet werden.



**Abbildung 3-18:** Röntgenkristallstruktur der Verbindung **23a**

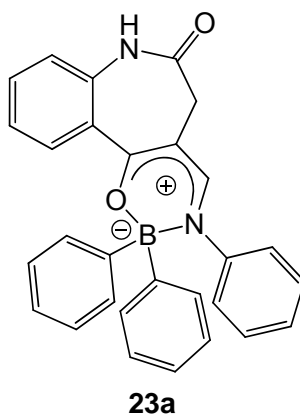
Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

Ausgewählte Bindungslängen und -winkel sowie Torsionswinkel sind in Tabelle 3-9 zusammengefasst.

**Tabelle 3-9:** Bindungslängen und -winkel der Kristallstruktur **23a**

Bindungslängen [Å]		Bindungswinkel [°]		Torsionswinkel [°]	
B-C(25)	1.621(2)	C(19)-B-C(25)	116.60(12)	C(12)-C(4)-C(5)-O(2)	-3.7(2)
B-C(19)	1.616(2)	C(19)-B-O(2)	106.90(12)	C(4)-C(5)-O(2)-B	-22.1(2)
O(2)-B	1.528(2)	C(25)-B-O(2)	106.97(13)	N(2)-B-O(2)-C(5)	35.05(18)
N(2)-B	1.608(2)	C(19)-B-N(2)	108.92(13)	O(2)-B-N(2)-C(12)	-26.76(18)
C(12)-N(2)	1.3172(19)	C(25)-B-N(2)	110.64(12)	C(4)-C(12)-N(2)-B	6.3(2)
C(5)-O(2)	1.3176(17)	O(2)-B-N(2)	106.24(11)	C(5)-C(4)-C(12)-N(2)	11.4(2)
C(4)-C(12)	1.411(2)				
C(4)-C(5)	1.377(2)				

Analog zum untersuchten Difluoroborkomplex **22a** befinden sich die Längen der Kohlenstoffbindungen (1.377 bzw. 1.411 Å) des Chelatrings von **23a** zwischen den Werten für eine einfache C-C- (1.34 Å) und eine doppelte C=C- (1.54 Å) Bindung. Auch die C-O- (1.3176 Å) sowie die C-N-Bindung (1.3172 Å) liegen im Bereich zwischen jeweiliger Einfach- und Doppelbindung. Diese Ergebnisse beschreiben analog zum Aufbau der Verbindung **22a** eine Resonanzstruktur des Chelatringes im festen Zustand, die durch Delokalisation der Elektronen und Verteilung der positiven Ladung über die fünf Atome des zweizähligen Liganden ausgezeichnet wird (Abb. 3-19).

**Abbildung 3-19:** Verteilung der positiven Ladung im Borchelatkomplex **23a**

Sowohl die B-N- (1.608 Å) als auch die B-O-Bindung (1.528 Å) sind im Vergleich zu den entsprechenden Bindungen des Difluoroborkomplexes **22a** (B-N = 1.576 Å; B-O = 1.466 Å) gestreckt. Esparza-Ruiz et al.<sup>118</sup> beschreiben einen sechsgliedrigen Diphenylborkomplex mit koordinativer B-N- (1.685 Å) und kovalenter B-O-Bindung (1.452 Å). Die

ermittelte Röntgenkristallstruktur für **23a** weist im Vergleich dazu eine kürzere B-N- und eine längere B-O-Bindung auf.

Eine Darstellung durch zwei mesomere Grenzformeln als Enaminoketon oder Enolimin ist möglich (Abb. 3-20).

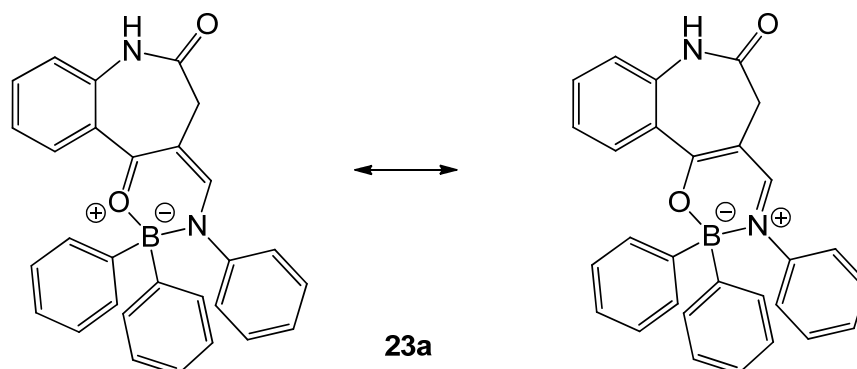


Abbildung 3-20: Mesomere Grenzstrukturen der Verbindung **23a**

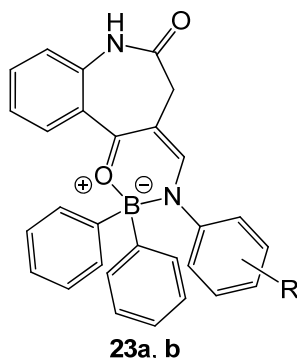
Die Kohlenstoffatome C5, C4 und C12 sowie das Sauerstoffatom O2 befinden sich annähernd in einer Ebene und es bilden sich größere Torsionswinkel im Vergleich zu **22a** von mehr als 35 ° um das Stickstoff- und das Boratom aus (vgl. Tab. 3-9). Dadurch ist das Boratom weiter als bei der Difluorborverbindung **22a** aus der Ringebene herausgehoben.

Beim Vergleich der Bindungswinkel am Boratom zwischen **22a** und **23a** fällt bei letzterer die starke Dehnung des C19-B-C25-Winkels auf 116 ° auf. Diese Vergrößerung wird vermutlich durch die Raumbeanspruchung der Phenylreste bei **23a** im Vergleich zu den Fluorliganden bei **22a** verursacht.

#### 3.4.6.2 Stabilitätsdaten der Verbindungen 23

Die Verbindungen **23** sind im festen Zustand stabil, weisen allerdings in DMSO-Lösung Instabilität auf. Eine Stabilitätsuntersuchung wurde mit den in DMSO gelösten Verbindungen **23a** und **b** durchgeführt. Direkt nach Herstellung der Lösung sowie nach einer und vier Wochen Aufbewahrung bei Raumtemperatur wurde der prozentuale Anteil des Komplexes mittels HPLC bestimmt (Tab. 3-10). Anschließend an jede Messung wurde ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum aufgenommen, um entstandenen Zersetzungsprodukten eventuell Strukturelemente zuordnen zu können.

**Tabelle 3-10:** Prozentuale Anteile<sup>a</sup> der Verbindungen **23** zu verschiedenen Zeitpunkten nach Lösung in DMSO



Substanzen <b>23</b>	R	sofort	7 d <sup>b</sup>	28 d <sup>b</sup>
<b>a</b>	H	94.7%	86.9%	21.2%
<b>b</b>	3-OCH <sub>3</sub>	94.0%	75.8%	12.6%

<sup>a</sup> Bestimmt durch HPLC, AUC 100%-Methode.

<sup>b</sup> d: Tage

Kurz nach dem Lösungsvorgang wurden **23a** und **23b** mit einer Konzentration von > 94% detektiert und wiesen keine unerwünschten Signale in den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren auf. Bereits nach einer Woche zeigte sich eine deutliche Abnahme der Reinheit in der Lösung auf 86.9% bzw. 75.8%. Für die entstandenen Zersetzungsprodukte konnten in den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren eine Vielzahl von Signalen geringer Intensität ermittelt werden. Nach vier Wochen lag Verbindung **23a** nur noch zu 21.2% vor. Unter den Zersetzungsprodukten dominierte mit einem Anteil von 60% das Edukt **54a** wie anhand des UV-Spektrums des entsprechenden Peaks gezeigt werden konnte. Den nach vier Wochen entstandenen zahlreichen Zersetzungsprodukten von **23b** konnte keine Struktur zugeordnet werden.

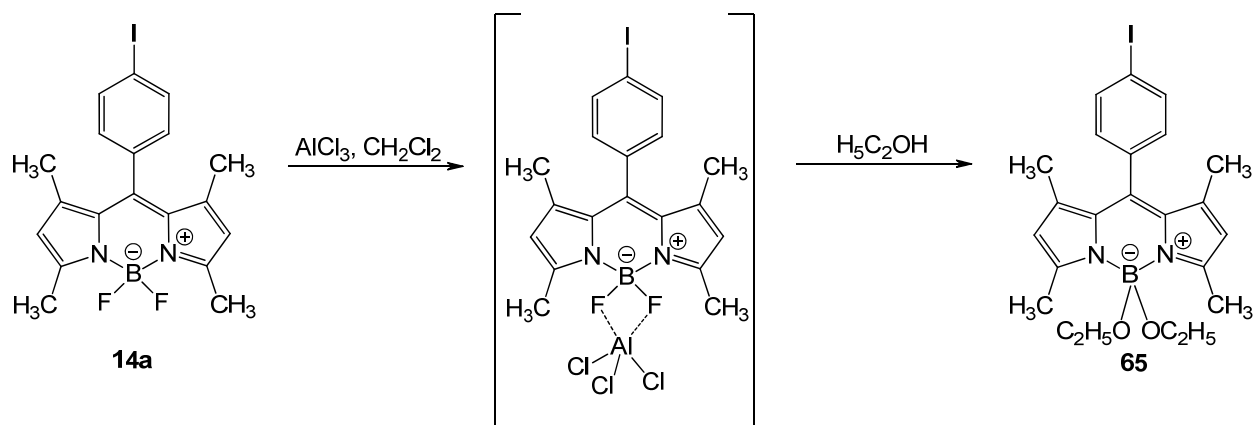
Im Unterschied zu den analogen Difluoroborderivaten **22a** und **22n** zersetzen sich die Diphenylborkomplexe **23a** und **23b** in DMSO-Lösung. Die größere Stabilität der Verbindungen **22** kann dadurch erklärt werden, dass der Elektronenzug der Fluor-substituenten die Lewis-Säureeigenschaften des Boratoms verstärkt und so die Elektrophilie gegenüber den freien Elektronenpaaren der Heteroatome des Chelatliganden vergrößert. Die Bindungen zwischen dem Boratom und dem Sauerstoff- bzw. dem Stickstoffatom können dadurch im Vergleich zu den Bindungen des diphenyl-substituierten Boratoms in **23** gefestigt sein. Zusätzlich sprechen die vergleichsweise

längeren Bindungen des Boratoms zum Chelatliganden in der Struktur von **23a** (s. oben) für schwächere, leichter spaltbare Bindungen zwischen dem Boratom und dem Chelatliganden im Heterozyklus.<sup>119</sup>

### 3.4.7 Darstellung von Dialkoxyborkomplexen 49

Zur Erweiterung der Klasse der auf den Enaminonen **54** basierenden Borkomplexe sollten die Fluorreste der Difluorborverbindungen **22** durch Alkoxygruppen substituiert werden. Tahtaoui et al.<sup>120</sup> beschreiben die einfache Umsetzung eines BODIPY-Derivates **14a** mit verschiedenen Alkoholen in Gegenwart von Aluminiumchlorid zu Alkoxy- und Aryloxyborkomplexen.

Die Lewis-Säure  $\text{AlCl}_3$  interagiert nach Ergebnissen der Autoren mit den Fluorsubstituenten des Boratoms. Obwohl diese Zwischenprodukte nicht isoliert und analysiert werden konnten, wird eine Aktivierung der B-F-Bindung durch Wechselwirkung der freien Elektronenpaare der Fluoratome mit dem Aluminiumchlorid angenommen. Dadurch wird ein nucleophiler Angriff am Boratom durch Alkohole erleichtert. Abbildung 3-34 zeigt die Umsetzung des BODIPY-Derivates **14a** mit Ethanol sowie die postulierte Übergangsstruktur.

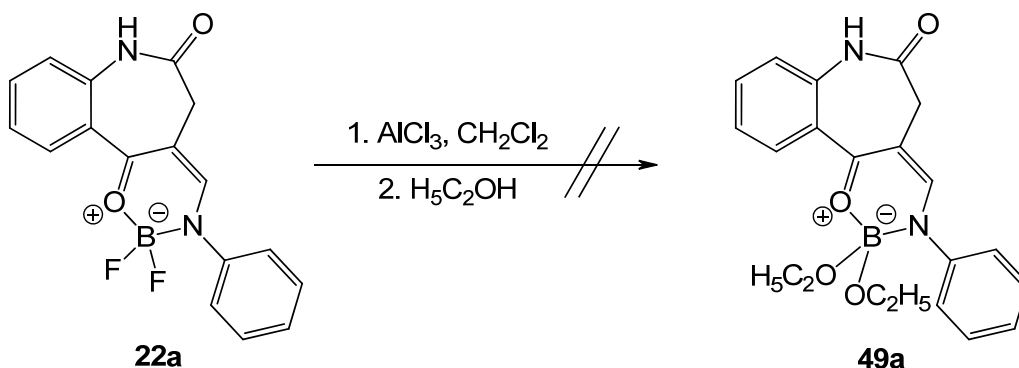


Schema 3-34: Darstellung des Alkoxyborkomplexes **65** nach Tahtaoui et al.<sup>120</sup>

Analog zu dieser Vorschrift wurde der Difluoroborkomplex **22a** in getrocknetem Dichlormethan zunächst mit Aluminiumchlorid zum Reflux erhitzt. Da die Verbindung **22a** weitere Atome mit freien Elektronenpaaren trägt, die als Lewis-Basen das Aluminiumchlorid binden können, wurde das Reagenz in erhöhter Konzentration eingesetzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde getrockneter Ethanol zutropft. Durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen konnte keine



Umsetzung von **22a** festgestellt werden (Schema 3-35). Auch anschließendes Erhitzen zeigte keine Entstehung des Produktes **49a**, dagegen wurde der Borkomplex gespalten und das Enaminon **54a** zurückgewonnen.

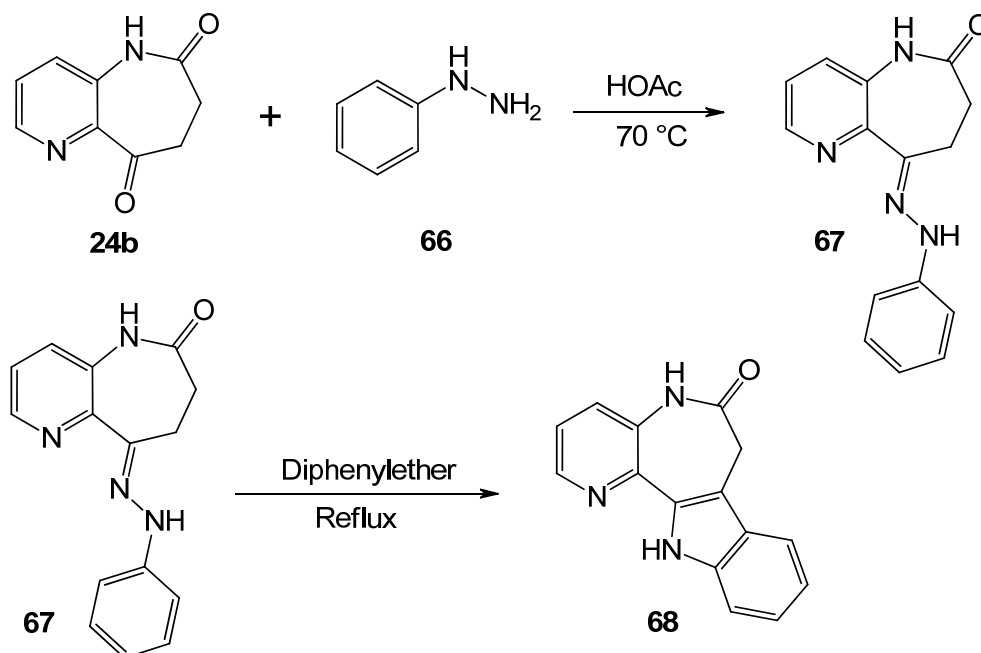


Schema 3-35: Angestrebte Darstellung des Diethoxyborkomplexes **49a**

### 3.4.8 Difluoroborkomplexe aus 1-Azapauillon **68** und 1-Azahydrazon **67**

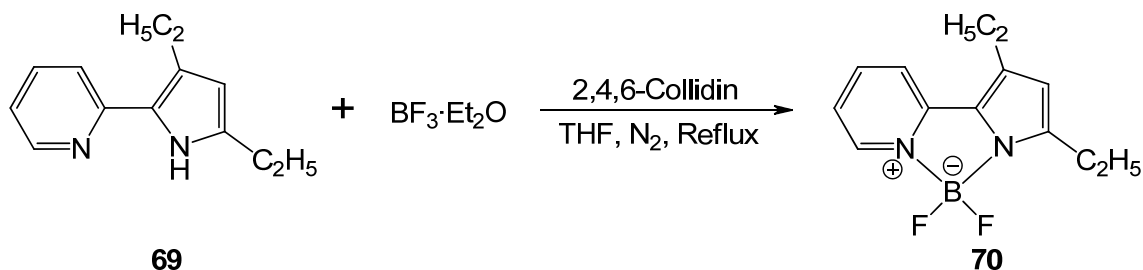
7,12-Dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**68**), welches das unsubstituierte Analogon der neuartigen Verbindungen **21a** und **21b** darstellt, sollte mit Bortrifluorid-Etherat zum *N,N*-Difluoroborkomplex **50** umgesetzt werden.

Zunächst wurde nach Stukenbrock<sup>77</sup> das Hydrazon **67** aus dem Pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion **24b** und Phenylhydrazin (**66**) in Eisessig hergestellt. Nach dessen Isolierung wurde der Ringschluss zum 1-Azapauillon **68** durch eine thermische Fischer-Indol-synthese in siedendem Diphenylether erreicht (Schema 3-36).



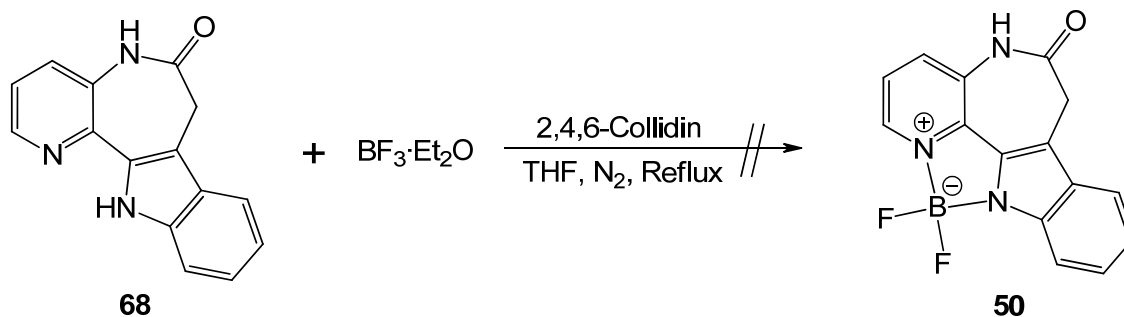
Schema 3-36: Darstellung des 1-Azapallons **68**

Ein fünfgliedriger Difluoroborkomplex **70** mit einem *N,N*-Chelatliganden wurde von Klappa et al.<sup>98</sup> aus 3,5-Diethyl-2-(2'-pyridyl)pyrrol (**69**) entwickelt (Schema 3-37).



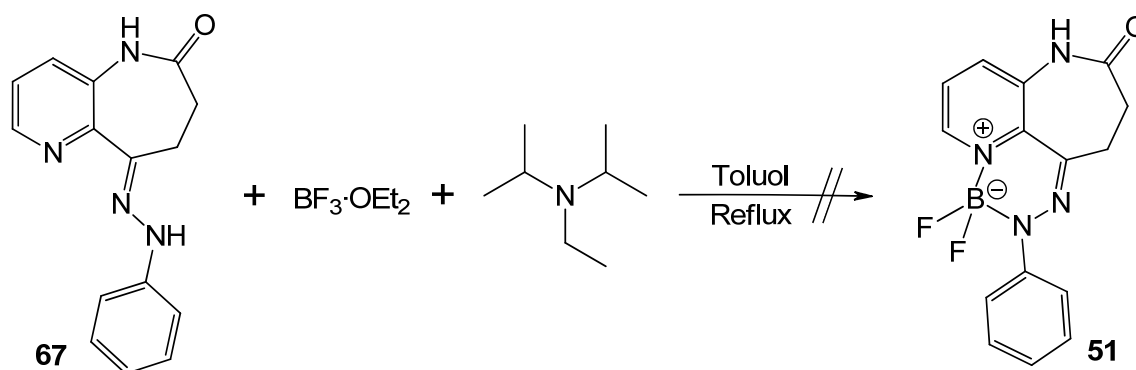
Schema 3-37: Synthese des Borkomplexes **70** nach Klappa et al.<sup>98</sup>

Beim Erhitzen des 1-Azapallons **68** mit Bortrifluorid in Gegenwart von 2,4,6-Collidin als Base (Schema 3-38) zeigte sich jedoch keinerlei Umsetzung zum Borkomplex **50**.



Schema 3-38: Angestrebte Darstellung des Difluoroborkomplexes **50**

Die Ausbildung des Borkomplexes wird hier wahrscheinlich dadurch erschwert, dass in **50** die planare Anordnung der stickstoffhaltigen Ringsysteme durch Ringspannungseffekte erschwert ist. Diese Effekte sollten sich bei der Darstellung der angestrebten Zielstruktur **51** weniger stark auswirken, zu deren Synthese das Hydrazon **67** mit Bortrifluorid-Etherat in Toluol in Gegenwart von Ethyldiisopropylamin erhitzt wurde (Schema 3-39). Unter diesen Reaktionsbedingungen entstand jedoch ein komplexes Produktgemisch, aus dem keine reinen Verbindungen isoliert werden konnten.



Schema 3-39: Angestrebte Darstellung des Difluoroborkomplexes **51**

### 4 Spektroskopie der Borverbindungen 22 und 23

Zur Aufklärung biochemischer Vorgänge in Zellen und zur Beobachtung der zellulären Effekte von Fremdstoffen wird häufig die nichtinvasive Methode der Fluoreszenzmikroskopie angewandt. Diese zeitlich nahezu unbefristete Art der Darstellung intakter, lebender Zellen benötigt den Einsatz fluoreszierender Moleküle. Da das Kuppeln von Fluoreszenzmarkern an biologisch aktive Substanzen deren biochemische Eigenschaften verändert, stellen bioaktive Moleküle mit integriertem Fluorophor eine optimale Kombination zur Beobachtung der biologischen Einflüsse auf die Zelle dar.

Vorteilhafte spektroskopische Eigenschaften für den Einsatz in der Fluoreszenzmikroskopie sind vor allem eine hohe Quantenausbeute  $\Phi_F$ , eine große Stokes-Verschiebung (Stokes' Shift) und langwellige Anregungs- und Emissionswellenlängen. Bei hoher Quantenausbeute verursacht einerseits die zur Anregung benötigte geringe Lichtintensität nur eine minimale Belastung der lebenden Zellen, andererseits resultiert in diesem Fall eine ausgeprägte Fluoreszenzemission in einer problemlosen, wenig störanfälligen Detektion.

Die zur Inhibition von Proteinkinasen entwickelten Borverbindungen **22** und **23** sind zur Fluoreszenzemission anregbar. Bereits für die Edukte **54** wurde diese Eigenschaft festgestellt, deren Ausprägung durch die Einführung des Borheterozyklus' optimiert werden sollte. Die spektroskopischen Daten sowie der Einfluss der Substituenten auf die Fluoreszenzeigenschaften werden im Folgenden dargestellt und erläutert.

#### 4.1 Absorptionsspektroskopie

##### 4.1.1 Grundlagen der Absorption

Von Strahlungsquellen ausgesandtes Licht breitet sich linear in alle Raumrichtungen aus. Durch diese Strahlung wird sowohl ein elektrisches als auch ein magnetisches Feld induziert, worauf die klassische Beschreibung des Lichtes als elektromagnetische Welle basiert. Durch die Welleneigenschaften der Lichtstrahlung können Effekte wie Beugung, Brechung und Polarisation veranschaulicht werden. Andererseits ist auch die Darstellung des Lichtes als ein Strom massenloser, energietransportierender Teilchen anerkannt. Wechselwirkungen dieser als Lichtquanten oder Photonen bezeichneten

Teilchen mit Materie wie Absorptions- und Emissionsvorgänge sind auf diese Weise erklärbar.<sup>121-122</sup>

Die UV/VIS-Spektroskopie untersucht Interaktionen elektromagnetischer Strahlung einer Wellenlänge von 200 bis 800 nm mit Materie. Das Licht wird entsprechend der enthaltenen Energie  $E$  unterteilt, die über die Konstante des Planckschen Wirkungsquantums  $h$  ( $6.63 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ ) proportional mit der Schwingungsfrequenz  $\nu$  verbunden ist.<sup>100</sup>

$$E = h \cdot \nu$$

Auf Grund einer konstanten Fortpflanzungsgeschwindigkeit  $c$  des Lichtes (im Vakuum  $c = 2.998 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) kann von der Frequenz  $\nu$  auf eine zugehörige Wellenlänge  $\lambda$  geschlossen werden.

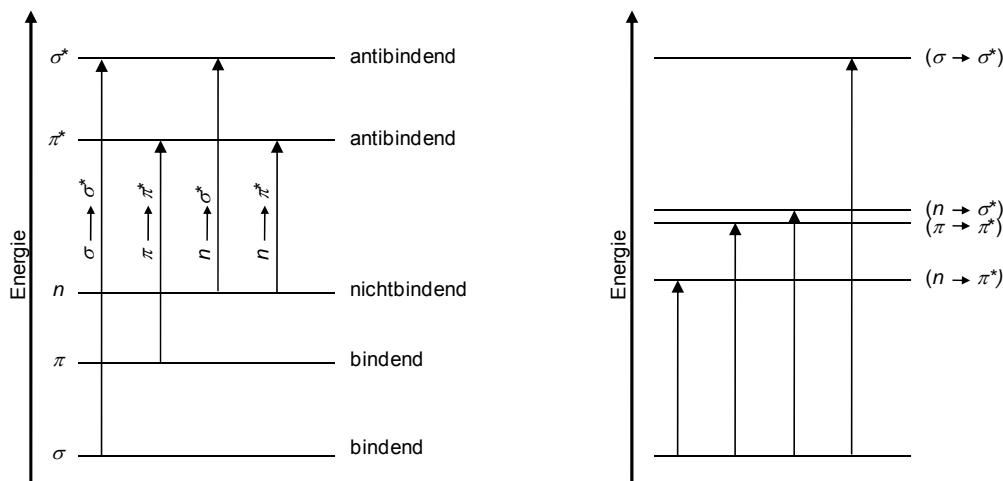
$$E = h \cdot c / \lambda$$

Da die Wellenlänge  $\lambda$  sich antiproportional zur Energie  $E$  verhält, wird zur Erzielung eines proportionalen Zusammenhanges der reziproke Wert der Wellenlänge  $\lambda$ , die Wellenzahl  $\nu^*$  als Einheit verwendet.<sup>100</sup>

$$E = h \cdot c \cdot \nu^*$$

Trotz dieser Proportionalität wird auf der Abszisse von UV/VIS-Spektren historisch bedingt die Wellenlänge  $\lambda$  angegeben und nur einzelne Werte wie der Stokes' Shift mit der Wellenzahl  $\nu^*$  beschrieben.<sup>121</sup>

Moleküle sind in der Lage, elektromagnetische Strahlung zu absorbieren, wodurch mit zunehmender Strahlungsenergie Effekte wie Molekülbewegung, elektronische Anregung oder Bindungsspaltung ausgelöst werden. Die elektronische Anregung beschreibt das Anheben von Elektronen unter Energieaufnahme aus bindenden Molekülorbitalen ( $\sigma$ - und  $\pi$ -Elektronen) sowie aus den Orbitalen einsamer Elektronenpaare ( $n$ -Elektronen) in energetisch höhere Zustände. Nach den quantenmechanischen Beschreibungen kommen dafür allein die definierten Bereiche energiereicher, antibindender Molekülorbitale in Betracht (Abb. 4-1, links).<sup>123</sup> Es kann vom Molekül für die Anregung nur die Wellenlänge aufgenommen werden, deren Energie genau der energetischen Differenz zwischen den am Übergang beteiligten Orbitalen entspricht.



**Abbildung 4-1:** Elektronenübergänge im Molekülorbitaldiagramm (links) und im Jablonski-Diagramm (rechts) (nach Schmidt<sup>121</sup> und Skoog/Leary<sup>123</sup>)

Das Jablonski-Diagramm (Abb. 4-1, rechts) beschreibt schematisch die Energiedifferenzen zwischen den Orbitalen. Sie sind abhängig von dem Element, zu dem das Elektron gehört, von der Bindung, an der das Elektron beteiligt ist sowie von der Molekülstruktur. Anhand der Diagramme wird deutlich, dass  $n$ - und  $\pi$ -Elektronen die geringste Energie für den Übergang in ein antibindendes Orbital benötigen. Folglich können Substanzen, die Mehrfachbindungen oder Heteroatome mit nichtbindenden Elektronen besitzen, durch vergleichsweise langwellige und energiearme Strahlung angeregt werden. Bei Absorption von Wellenlängen zwischen 200 und 800 nm werden diese als Chromophore bezeichnet und von der UV/VIS-Spektroskopie erfasst.

Bezüglich der Gesamtorbitalzahl eines Moleküls sind vor allem das energiereichste, besetzte (HOMO) sowie das energetisch niedrigste, unbesetzte Molekülorbital (LUMO) von Bedeutung. Zwischen ihnen besteht die geringste Energiedifferenz aller Orbitale im Molekül, die meist zwischen  $\pi$ - oder  $n$ -Orbitalen und den  $\pi^*$ -Orbitalen vorliegt.<sup>122</sup>

Tritt im Molekül ein konjugiertes Doppelbindungssystem auf, so sind die  $\pi$ -Elektronen delokalisiert und leichter anregbar. HOMO und LUMO nähern sich mit zunehmender Länge dieses Systems energetisch weiter aneinander an. Durch funktionelle Gruppen, die mesomer konjugiert sind oder elektronenschiebende Eigenschaften aufweisen und durch Umgebungseinflüsse wie Lösungsmittel-, pH-Wert- und Temperaturänderungen kann die Energiedifferenz zusätzlich reduziert werden.<sup>123-124</sup>

Bei der Anregung von Elektronenübergängen zwischen  $S_0$ - und  $S_1$ -Zustand kommt es unter Energieaufnahme zusätzlich zu einer Veränderung des Schwingungs- und

Rotationszustandes des Moleküls. Diese verschiedenen konformatorischen Zustände unterscheiden sich in ihrem Energieniveau geringfügig vom Grundzustand des Moleküls. Die Absorptionsmaxima treten somit durch die Überlagerung mit vibratorischen und rotatorischen Anregungen als verbreiterte Absorptionsbanden auf. Die Feinstruktur solcher Absorptionsbanden ist in Lösung auf Grund eingeschränkter Beweglichkeit der Moleküle wenig ausgeprägt.<sup>121,124</sup>

Die Absorption lässt sich als die Differenz zwischen der Intensität des auf eine Lösung der zu untersuchenden Substanz eingestrahlten ( $I_0$ ) und transmittierten ( $I$ ) Lichtes berechnen. Das Lambert-Beersche Gesetz vermittelt den Zusammenhang zwischen der Abnahme der Lichtintensität und der Konzentration ( $c \leq 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) sowie der Schichtdicke  $d$  (cm) der Lösung.

$$A = \log I_0 / I = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Der molare Absorptionskoeffizient  $\varepsilon$  beschreibt als stoffspezifische Größe die Absorptionsfähigkeit der untersuchten Substanz.<sup>100,124</sup>

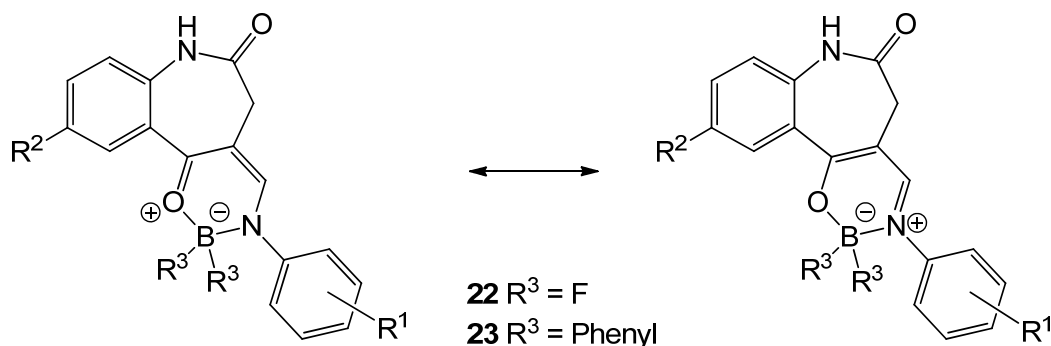
#### 4.1.2 Absorptionseigenschaften der Verbindungen 22 und 23

Zur Bestimmung der spektroskopischen Eigenschaften der Moleküle **22** und **23** wurden jeweils die Absorptionsspektren im Bereich von 200-550 nm aufgenommen. Um einen maximalen Wert von 1 für die Absorption  $A$  zu erhalten, wurde die Konzentration  $c$  der untersuchten Lösungen sehr gering gewählt (ca.  $c = 0.04 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Eine Absorption von 1 resultiert nach dem Lambert-Beerschen Gesetz aus einer 90-prozentigen Absorption des eingestrahlten Lichtes und stellt mit einer Transmission von 10% eine hohe Präzision der Messung sicher.

Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die Ausprägung des Spektrums zu beschränken, sollte ein möglichst unpolares Lösungsmittel gewählt werden. Zusätzlich sollte zur Bestimmung eines ersten Absorptionsmaximums bei Werten um 200 nm die *cut-off*-Wellenlänge des Lösungsmittels bei sehr niedrigen Wellenlängen liegen. Wasser und andere polare, protische Lösungsmittel wie Alkohole mit besonders kurzwelligen Selbstabsorptionsbereichen waren auf Grund ihrer Polarität, einer schlechten Löslichkeit der Substanzen **22** und **23** und möglicher Hydrolyseeigenschaften nicht geeignet. Auch stark unpolare Lösungsmittel wie *n*-Hexan, die erst unterhalb von 200 nm absorbieren, wurden wegen schlechter Lösungsfähigkeit nicht eingesetzt. Es wurde Acetonitril mit einer *cut-off*-Wellenlänge von 190 nm und mittlerer Polarität gewählt.<sup>125</sup>

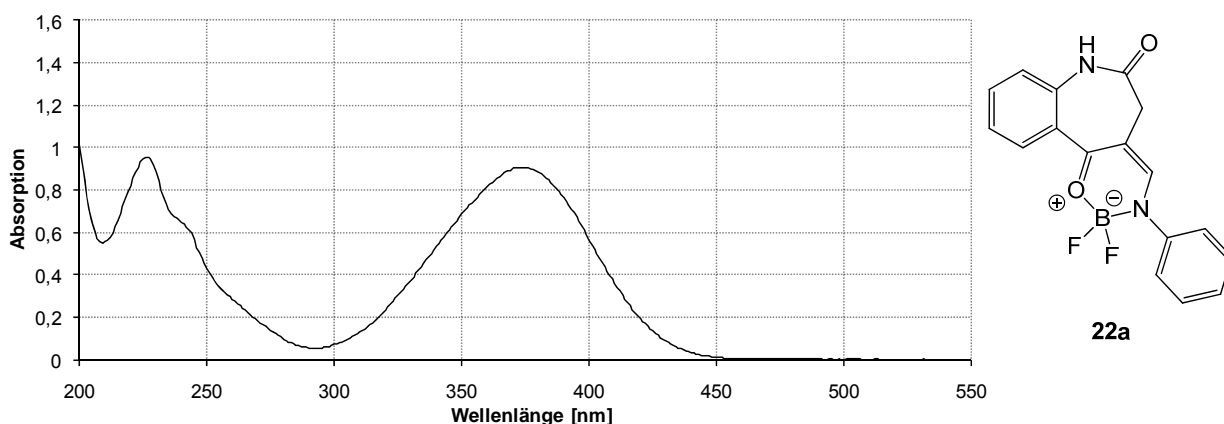
#### 4 Spektroskopie der Borverbindungen

Die allgemeine Struktur der Verbindungen **22** und **23** erlaubt die theoretische Beschreibung einer Elektronenkonjugation zwischen dem *N*-Phenylrest und dem Benzoanellanden der Benzazepinstruktur (Abb. 4-2).



**Abbildung 4-2:** Mesomere Grenzstrukturen der Verbindungen **22** und **23**

Die in den Röntgenkristallstrukturen (Kapitel 3.4.4.2 und 3.4.6.2) gemessenen Bindungslängen unterstützen diese Beschreibung. Abbildung 4-3 stellt exemplarisch das Absorptionsspektrum von **22a** dar, die Spektren aller übrigen Verbindungen **22** sowie **23** sind im experimentellen Teil (Kapitel 8.3) aufgeführt.



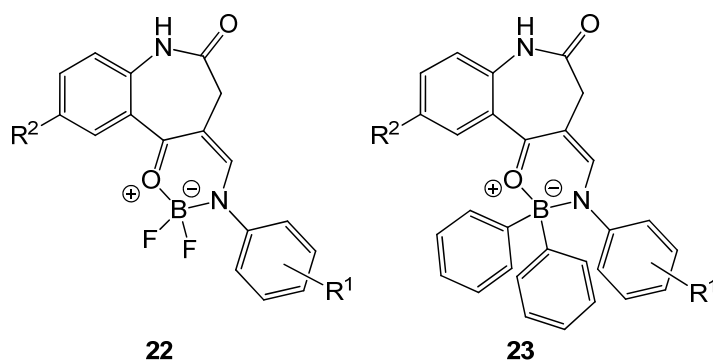
**Abbildung 4-3:** Absorptionsspektrum von **22a**

Die Verbindungen **22** und **23** zeigen ein schmales Absorptionsmaximum zwischen 220 und 240 nm mit einer Schulter im absteigenden Ast sowie ein weiteres, als breiter Peak auftretendes Maximum bei 350 bis 410 nm. Die Maxima sowie die molaren Absorptionskoeffizienten repräsentativer Verbindungen sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Durch die Absorption kurzer Wellenlängen des sichtbaren Bereiches ab 400 nm sind die Verbindungen **22** und **23** gelb bis orange gefärbt.



**Tabelle 4-1:** Absorptionsmaxima ( $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ ) und molarer Absorptionskoeffizient  $\varepsilon$  der Verbindungen **22** und **23**<sup>a</sup>



Verbindungen 22 und 23	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ [nm]	$\varepsilon$ [M <sup>-1</sup> · cm <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup>
<b>22a</b>	H	H	227, 374	2.3 · 10 <sup>4</sup>
<b>22b</b>	4-CF <sub>3</sub>	H	227, 377	2.3 · 10 <sup>4</sup>
<b>22c</b>	4-NO <sub>2</sub>	H	226, 391	2.5 · 10 <sup>4</sup>
<b>22d</b>	2-Br	H	224, 364	2.0 · 10 <sup>4</sup>
<b>22f</b>	4-Br	H	227, 378	2.6 · 10 <sup>4</sup>
<b>22g</b>	4-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	227, 385	2.3 · 10 <sup>4</sup>
<b>22h</b>	4-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	227, 377	2.3 · 10 <sup>4</sup>
<b>22i</b>	2-Cl	H	221, 364	2.2 · 10 <sup>4</sup>
<b>22j</b>	4-I	H	227, 380	2.5 · 10 <sup>4</sup>
<b>22k</b>	4-CH <sub>3</sub>	H	227, 377	2.4 · 10 <sup>4</sup>
<b>22l</b>	4-OCH <sub>3</sub>	H	227, 384	2.3 · 10 <sup>4</sup>
<b>22m</b>	3,5-Cl	H	226, 379	2.5 · 10 <sup>4</sup>
<b>22n</b>	3-OCH <sub>3</sub>	H	226, 376	2.2 · 10 <sup>4</sup>
<b>22r</b>	2-CH <sub>3</sub>	H	225, 359	2.4 · 10 <sup>4</sup>
<b>22s</b>	2-OCH <sub>3</sub>	H	224, 369	2.0 · 10 <sup>4</sup>
<b>22u</b>	2-OCH <sub>3</sub>	I	235, 248, 370	1.9 · 10 <sup>4</sup>
<b>22v</b>	2-Cl	I	234, 250, 356	2.4 · 10 <sup>4</sup>
<b>22w</b>	4-CH <sub>3</sub>	I	237, 379	2.2 · 10 <sup>4</sup>
<b>23a</b>	H	H	231, 403	1.4 · 10 <sup>4</sup>
<b>23b</b>	3-OCH <sub>3</sub>	H	404	1.4 · 10 <sup>4</sup>
<b>23c</b>	2-OCH <sub>3</sub>	H	395	1.1 · 10 <sup>4</sup>

<sup>a</sup> Bestimmt im langwelligsten Absorptionsmaximum.

Auf das erste Absorptionsmaximum der Substanzen **22** wird ein Einfluss des Substituenten ( $R^2$ ) am Benzoanellanden der Benzazepinstruktur vermutet. Diese Überlegung wird gestützt durch die Ähnlichkeit des Maximums in Form und Lage bei den Verbindungen **22** ohne Substituenten  $R^2$ . Dagegen zeigt es bei den iodsubstituierten Verbindungen **22u**, **v** und **w** eine bathochrome Verschiebung um ca. 10 nm. Der positive mesomere Effekt des Iodsubstituenten könnte eine vergrößerte Konjugation des  $\pi$ -Elektronensystems und eine leichtere Anregbarkeit der Elektronen erzeugen. Zusätzlich tritt bei den Verbindungen **22u**, **v** und **w** eine Schulter im absteigenden Verlauf der ersten Absorptionsbande stärker hervor, die im Spektrum von **22u** und **v** als ein zusätzliches Maximum beschrieben werden kann (Abb. 4-4). Dieser Effekt kann ebenfalls durch den Iodsubstituenten ausgelöst werden, dessen freie  $n$ -Elektronen auf Grund der Atomgröße leicht anregbar sind. Hieraus könnte ein weiterer Elektronenübergang resultieren, der als Schulter bzw. weiteres Maximum zu erkennen ist.

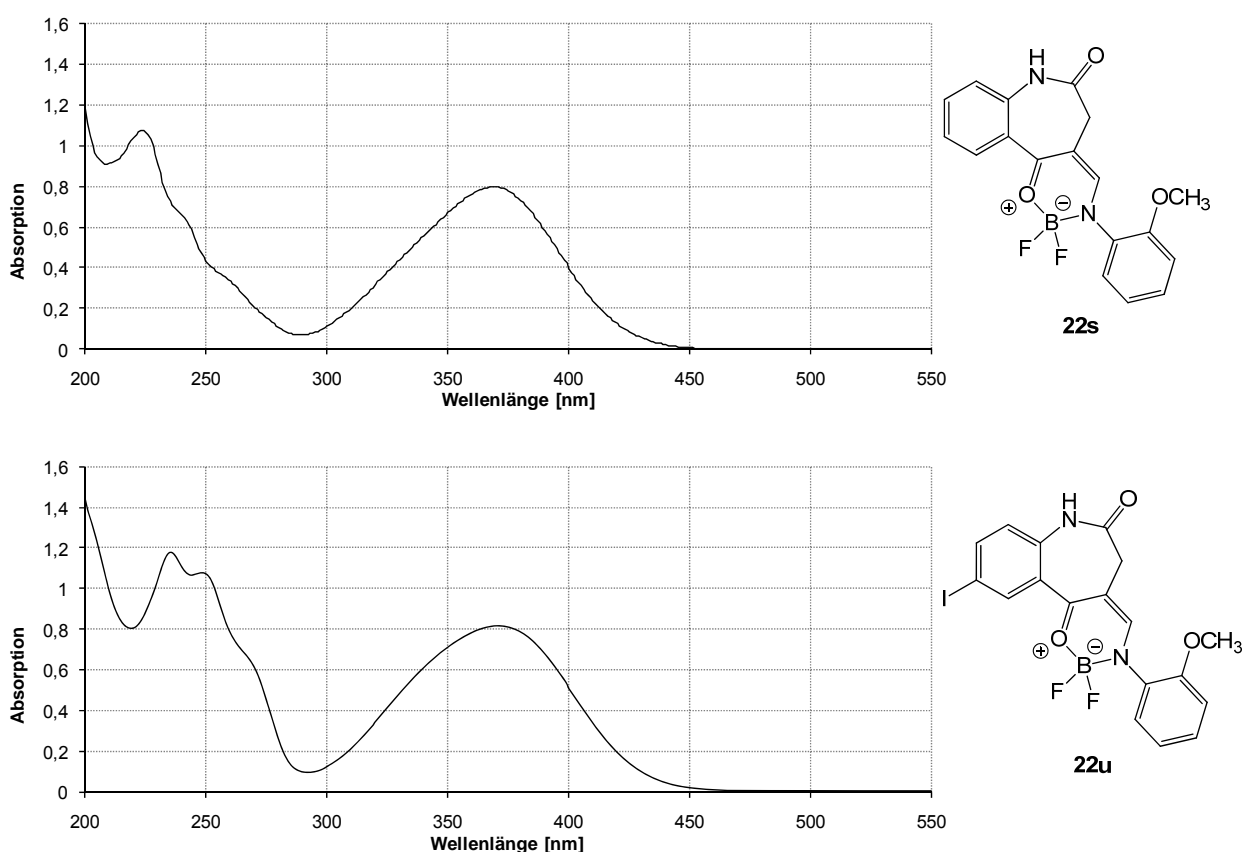


Abbildung 4-4: Absorptionsspektren der Verbindungen **22s** und **22u**

Größere spektrale Unterschiede der Verbindungen **22** finden sich beim Vergleich des jeweils langwelligsten Maximums. Allerdings können durch die Breite des Signals

Aussagen zum Einfluss der strukturellen Unterschiede, die sich bei der überwiegenden Anzahl der Verbindungen **22** nur in Art und Position des Restes  $R^1$  ausdrücken, nicht exakt getroffen werden.

Tendenziell bewirken Substituenten ( $R^1$ ) in *ortho*-Position des *N*-Phenylrestes eine hypsochrome Verschiebung im Vergleich zu *meta*- oder *para*-Substituenten. *Ortho*-ständige Reste können die planare Ausrichtung des *N*-Phenylringes zum restlichen Molekül sterisch behindern. Die Überlappung von  $\pi$ -Orbitalen kann dadurch eingeschränkt sein, so dass die Blauverschiebung der Anregungswellenlänge durch eine verringerte Konjugation dieses Elektronensystems erklärbar wäre.<sup>124</sup>

*Para*-Substituenten mit freien Elektronenpaaren in Mesomerie zum aromatischen Ring zeigen dagegen eine bathochrome Verschiebung des langwelligsten Absorptionsmaximums. Besonders stark wirkt sich dieser Effekt bei den Alkoxyresten der Verbindungen **22g** und **l** sowie der Nitrogruppe in **22c** aus. Der positive mesomere Effekt der Alkoxyreste auf den Aromaten erleichtert durch den Elektronenschub die Anregbarkeit der Elektronen. Dagegen verringert der Nitrorest durch einen negativen mesomeren Effekt die Elektronendichte im *N*-Phenylrest. In diesem Fall kann die längere Anregungswellenlänge durch einen intramolekularen Ladungstransfer erklärt werden.

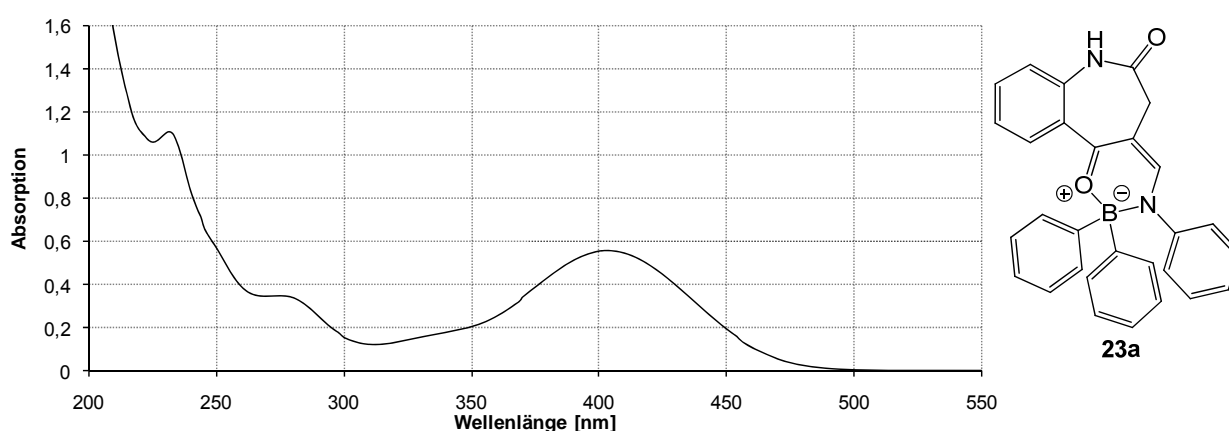
Durch *para*-Stellung von Elektronenakzeptor ( $-\text{NO}_2$ ) und Elektronendonator (Enamin-N) an einem konjugierten System (*push-pull*-Substitution) kann ein Elektron vom Donor zum Akzeptor übertragen werden. Dadurch verringert sich die Energie der Elektronenwechselwirkung und die beobachteten, sogenannten *Charge-Transfer*-Banden weisen Rotverschiebung auf.<sup>100</sup>

Halogensubstituenten üben auf den Aromaten, an den sie gebunden sind einerseits einen negativen induktiven, andererseits einen positiven mesomeren Effekt aus. Im Fall der Borverbindungen **22f** und **j** überwiegt der +M-Effekt und erzeugt eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums im Vergleich zum Signal der unsubstituierten Verbindung **22a**.

Die in Tabelle 4-1 aufgeführten Werte der molaren Absorptionskoeffizienten  $\varepsilon$  wurden jeweils für das langwelligste Absorptionsmaximum bestimmt, um einer stärkeren Substanzspezifität gerecht zu werden. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit der Verbindungen **22** sind weder in der Größe noch in der generellen Anregbarkeit der Moleküle große Unterschiede zu erwarten. Sämtliche ermittelten  $\varepsilon$ -Werte befinden sich im Bereich zwischen  $1.9$  und  $2.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Sie beschreiben eine mittlere Intensität

der Absorption.<sup>126</sup> Chromophore wie Carotin ( $\epsilon_{450\text{ nm}} = 1.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) und Chlorophyll a ( $\epsilon_{420\text{ nm}} = 8.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) zeigen deutlich höhere Werte.

Die Spektren der Diphenylborverbindungen **23** ähneln im Verlauf denen der Difluorborverbindungen **22**. Allerdings fällt das Signal im kurzwelligen Bereich kontinuierlich über einen breiten Wellenlängenbereich ab und ein bei **23a** detektierbares Maximum zwischen 200 und 250 nm ist bei **23b** und **c** nur als Schulter zu erkennen. Die zusätzliche Absorption von Strahlung im UV-Bereich durch die zwei eingefügten Phenylsubstituenten kann das Auftreten eines breiten Absorptionssignals durch Signalüberlagerung erklären (Abb. 4-5).



**Abbildung 4-5:** Absorptionsspektrum der Verbindung **23a**

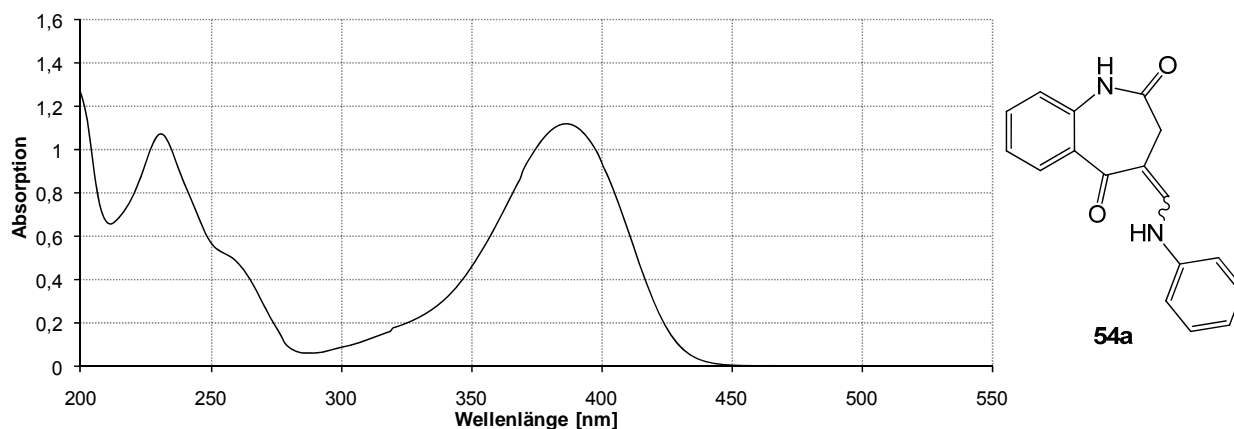
Das langwellige Absorptionsmaximum weist im Vergleich zum Signal der Verbindungen **22** eine bathochrome Verschiebung auf. Diese kann durch die Elektronegativitätsverringerung der Substituenten am Boratom ausgelöst werden. Ein weniger starker Elektronenzug der Phenylreste als der der Fluorsubstituenten bei **22** erhöht die Elektronendichte im Molekül und erleichtert folglich die Anregbarkeit.

Allerdings werden für die Verbindungen **23** trotz der höheren Elektronendichte und der zusätzlichen Vergrößerung der Struktur niedrigere molare Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon = 1.1\text{-}1.4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) berechnet.

### 4.1.3 Absorptionseigenschaften im Vergleich

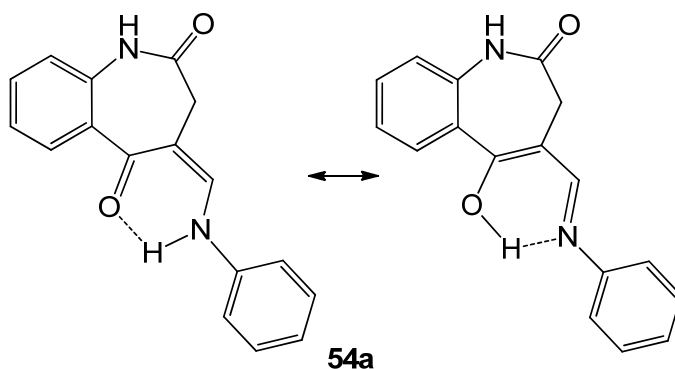
Das Absorptionsspektrum der Ausgangssubstanz **54a** weist im Verlauf große Ähnlichkeit zu den Spektren der Borkomplexe **22** auf. Die Maxima befinden sich bei 231 bzw. 386 nm und sind somit im Vergleich zu den Signalen des Difluoroborkomplexes

**22a** bathochrom verschoben, wobei das Maximum zwischen 350 und 400 nm stärker in den langwelligen Bereich gerückt ist (Abb. 4-6).



**Abbildung 4-6:** Absorptionsspektrum des Enaminons **54a**

Diese Vergleichbarkeit der Absorptionsspektren kann möglicherweise durch eine gleichartige strukturelle Konformation des Borkomplexes **22a** und des Enaminons **54a** erklärt werden. Eine Ähnlichkeit des 'Borchelatzyklus' mit dem Motiv der Resonanz-unterstützten Wasserstoffbrückenbindung (*resonance-assisted hydrogen bond*, RAHB) wurde bereits beschrieben (vgl. Kapitel 3). Untersuchungen an ausgewählten Enaminonen **54** hinsichtlich der *E/Z*-Isomerie wurden von Dunkel<sup>94</sup> durchgeführt, die auf die Bevorzugung der *Z*-Konfiguration hindeuteten. In dieser räumlichen Anordnung kann eine RAHB die Ausbildung eines *quasi*-Ringes mit delokalisiertem  $\pi$ -Elektronensystem (Abb. 4-7) ermöglichen, der eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu den Borkomplexen **22** aufweist.



**Abbildung 4-7:** Mesomere Grenzstrukturen der Verbindung **54a** mit RAHB

Folglich kann eine ähnliche Energiebilanz der vorhandenen Elektronen resultieren, so dass die energieärmsten Anregungsübergänge denen der Borverbindungen **22** entsprechen und eine vergleichbare Ausprägung der Absorptionsspektren auftritt. Das Einfügen der Bordifluoridgruppe verursacht dabei möglicherweise durch die hohe Elektronegativität der Fluorsubstituenten eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima bei **22a**.

Die Diphenylborverbindung **23a** zeigt dagegen eine Rotverschiebung des langwelligen Maximums im Vergleich zum Spektrum des Enaminons **54a** (Tab. 4-2).

**Tabelle 4-2:** Absorptionsmaxima ( $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ ) und molarer Absorptionskoeffizient  $\varepsilon$  der Verbindungen **22a**, **23a** und **54a**<sup>a</sup>

Verbindungen	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ [nm]	$\varepsilon$ [M <sup>-1</sup> · cm <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup>
<b>22a</b>	227, 374	$2.3 \cdot 10^4$
<b>23a</b>	231, 403	$1.4 \cdot 10^4$
<b>54a</b>	231, 386	$2.8 \cdot 10^4$

<sup>a</sup> Bestimmt im langwelligsten Absorptionsmaximum.

## 4.2 Lumineszenzspektroskopie

### 4.2.1 Grundlagen der Photolumineszenz

In Molekülen befinden sich die Valenzelektronen der Atome üblicherweise in den bindenden Molekülorbitalen ( $\sigma$ ,  $\pi$ ) oder in den nichtbindenden Orbitalen ( $n$ ) der freien Elektronenpaare. Diesen energetischen Grundzustand  $S_0$  besetzen sie gepaart mit einem weiteren Elektron entgegengesetzten Spins. Unter Beibehaltung seines Spins kann eines der Elektronen aus dieser Position durch Aufnahme einer definierten Energiemenge in ein spezifisches vibratorisches und rotatorisches Niveau eines energiereichen, elektronischen Zustandes (Singulettzustand  $S_1$ ,  $S_2$  etc.) versetzt werden. Anschließend kann das angeregte Elektron durch verschiedene Deaktivierungsprozesse in den Grundzustand  $S_0$  zurückkehren (Abb. 4-8).

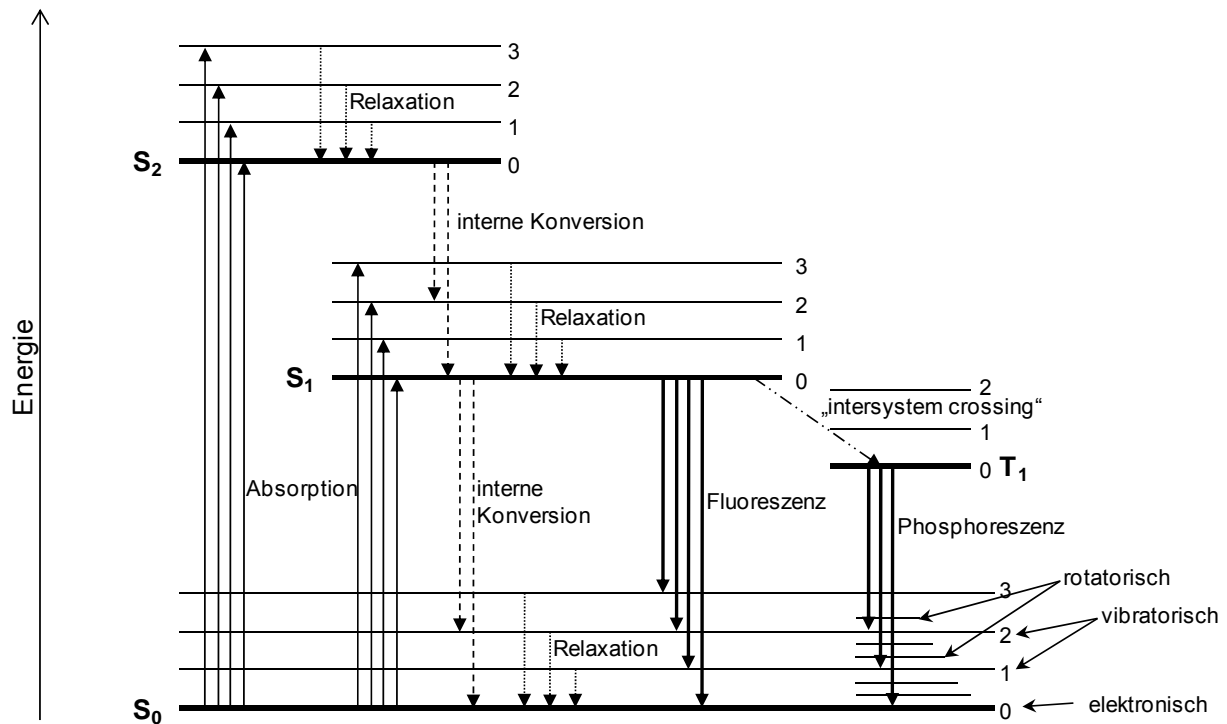


Abbildung 4-8: Energiediagramm photolumineszenter Abläufe (modifiziert nach Skoog/Leary<sup>123</sup> und Schmidt<sup>121</sup>)

Vom entsprechenden Schwingungs- und Rotationsniveau des energiereichen Zustandes fällt das Elektron zunächst schnell auf das Grundniveau des jeweiligen angeregten Zustandes ab. Diese Relaxation findet unter Abgabe von Schwingungsenergie als Wärme statt und benötigt eine geringe Zeitspanne von ca.  $10^{-12}$  s. Mittels interner Konversion kann das Elektron von diesem tiefsten Vibrationsniveau aus durch weitere Wärmeabstrahlung in einen elektronisch niedrigeren Zustand ( $S_2 \rightarrow S_1$  oder  $S_1 \rightarrow S_0$ ) zurückkehren.

Aus dem Grundniveau des ersten angeregten Zustandes  $S_1$  ist zusätzlich die Verminderung der Energie durch Photonenemission möglich. Innerhalb von ca.  $10^{-8}$  s kann das Elektron unter Abgabe von Fluoreszenzstrahlung in verschiedene Schwingungs- und Rotationsniveaus des Grundzustandes  $S_0$  gelangen. In diesem elektronischen Zustand tritt wiederum unter Wärmeabstrahlung die Relaxation des Elektrons in das niedrigste Energieniveau auf.

Da Fluoreszenzemission nur vom energetischen Grundniveau des angeregten Zustandes  $S_1$  auftritt, liegt die emittierte Strahlung meist bei längeren Wellenlängen als die Anregungswellenlänge. Für die Fluoreszenzcharakteristik ist es auf Grund der auftretenden Relaxationsvorgänge nicht relevant, in welche maximalen Energieniveaus

das Elektron anfangs angehoben wurde. Da sich die Energiedifferenzen der Vibrationsniveaus im angeregten Zustand  $S_1$  und im Grundzustand  $S_0$  ähneln, gleichen sich Absorptions- und Emissionsspektrum häufig wie Bild und Spiegelbild.

Andererseits kann das Elektron vom Grundniveau des  $S_1$ -Zustandes zunächst die als *intersystem crossing* bezeichnete Umwandlung des Elektronenspins in einen energieärmeren Triplettzustand  $T_1$  durchlaufen. Ausgehend von dieser Position wird die restliche Energie als Phosphoreszenzstrahlung abgegeben. Für diesen Weg beträgt das Zeitintervall  $10^{-4}$  bis 10 s.

Da eine möglichst kurze Dauer des angeregten Zustandes angestrebt wird, kehrt das Elektron auf dem Weg in den Grundzustand zurück, der die kürzeste Zeit benötigt. Photolumineszenz tritt bei Molekülen auf, bei denen die strahlungslose Deaktivierung durch strukturelle Eigenschaften und Umgebungsfaktoren so stark verlangsamt ist, dass die Emission kinetische Vorteile zeigt.<sup>123</sup>

Vor allem anellierte aromatische Systeme mit energiearmen  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen zeigen Fluoreszenz, deren Intensität durch ausgeprägte strukturelle Rigidität des Moleküls verstärkt wird. Neben der Struktur des Moleküls hängen die spektralen Verschiebungen und die Intensität der Fluoreszenzsignale von äußeren Einflüssen wie der Temperatur, der Viskosität und der Polarität des Lösungsmittels ab. Den intensivsten Effekt zeigt die Polaritätsveränderung des Lösungsmittels. Sowohl bei elektronischer Anregung als auch beim Rückgang in den Grundzustand reorientieren sich die Atomkerne und die umgebenden Lösungsmittelmoleküle langsamer ( $10^{-10}$  s) als die Veränderung des elektronischen Zustandes abläuft (Frank-Codon-Prinzip). Dadurch tritt zum Zeitpunkt der Fluoreszenzemission eine geringere Energiedifferenz zwischen angeregtem und Grundzustand auf als für die Anregung benötigt wurde. Die resultierende Rotverschiebung des Fluoreszenzsignals wird mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels vergrößert.<sup>127</sup>

Die Wellenlängendifferenz zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum einer Verbindung wird als Stokes-Verschiebung oder Stokes' Shift bezeichnet. Wie bereits erläutert ergibt sich die Verlängerung der Fluoreszenzwellenlänge im Vergleich zur Anregungswellenlänge einerseits aus konformatorischen Veränderungen des Moleküls im angeregten Zustand sowie aus Reorientierungseffekten des Lösungsmittels. Für diese Verschiebung wird ein großer Wert angestrebt, da bei Einsatz fluoreszierender Moleküle in analytischen Verfahren die Interferenz von anregender und emittierter Wellenlänge unerwünscht ist. Gestreutes oder reflektiertes Anregungslicht kann bei



ausreichend spektralem Abstand der Signale durch passende Filter entfernt werden.<sup>71,127</sup>

Einer der wichtigsten Parameter fluoreszenzbezogener Eigenschaften wird mit der Quantenausbeute  $\Phi_F$  beschrieben. Sie gibt den Anteil emittierter Photonen ( $I_F$ ) im Verhältnis zur Anzahl der insgesamt vom Molekül absorbierten Photonen ( $I_A$ ) an. Ein maximaler Wert von 1 bzw. 100% kann theoretisch erreicht werden, wenn alle aufgenommenen Photonen als Fluoreszenzstrahlung abgegeben werden und keine strahlungslose Deaktivierung der Elektronen auftritt.

$$\Phi_F = I_F / I_A$$

Durch die Umwandlung dieser allgemeinen Beschreibung, kann die Fluoreszenzintensität nach dem als Parker-Gesetz bezeichneten, folgenden Zusammenhang definiert werden.

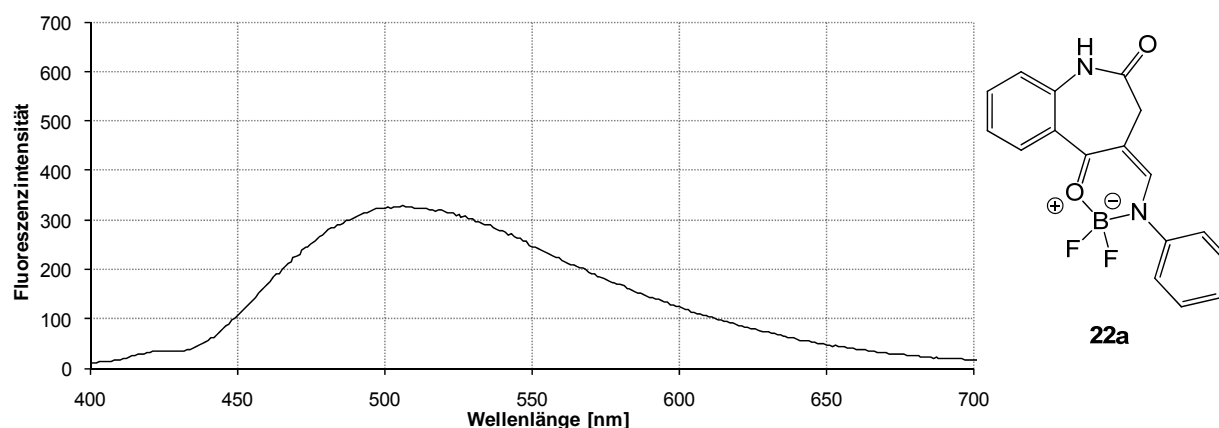
$$I_F = 2.303 \cdot \Phi_F \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Im Gegensatz zu den Zusammenhängen der Absorption beeinflusst die eingestrahlte Lichtintensität ( $I_0$ ) die Stärke der Fluoreszenz. Allerdings besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den Intensitäten nur in stark verdünnten Lösungen, unterhalb der optischen Dichte, bei der die Verbindung eine Absorption von ca. 0.05 zeigt. Quenching- und Selbstabsorptionseffekte wirken oberhalb dieses Punktes verstärkt auf die Fluoreszenzemission ein. Die Konzentration  $c$  sowie die Schichtdicke der durchstrahlten Lösung  $d$  werden daher in die Gleichung einbezogen.<sup>127</sup>

#### 4.2.2 Lumineszenzeigenschaften der Verbindungen 22 und 23

Die Emissionsspektren wurden von den, bei der Ermittlung der Absorptionsspektren genutzten, ca. 0.04-mmolaren Lösungen der Verbindungen **22** und **23** in Acetonitril aufgenommen. Diese Konzentrationen konnten trotz möglicher Quenchingeffekte, die die Absorptionswerte von ca. 1 vermuten lassen, eingesetzt werden, da zunächst die Fluoreszenzintensität nicht quantifiziert werden sollte. Zur Exzitation wurde jeweils diejenige Wellenlänge genutzt, bei der das langwelligste Absorptionsmaximum der Substanz auftrat.

Exemplarisch ist das Emissionsspektrum der Verbindung **22a** in Abbildung 4-9 dargestellt, die übrigen Spektren sind im experimentellen Teil (Kapitel 8.3) aufgeführt.



**Abbildung 4-9:** Emissionsspektrum der Verbindung **22a** in Acetonitril (Exzitationswellenlänge 374 nm)

Die Verbindung **22a** erzeugt ein breites Fluoreszenzsignal, wobei das Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 506 nm im sichtbaren Bereich liegt. Eine genaue Zuordnung der Emissionswellenlängen zu Fluoreszenzübergängen ist auf Grund einer großen Anzahl anregbarer  $n$ - und  $\pi$ -Elektronen sowie vieler möglicher Vibrations- und Rotationsniveaus nicht möglich. Die Breite des Emissionsmaximums ergibt sich aus der Überlagerung der energetisch unterschiedlichen Energiedifferenzen. Die Substanzen **22** und **23** zeigen ähnlich verlaufende Spektren mit breiten Signalen, deren Maxima in Tabelle 4-3 zusammengefasst sind.

Die ermittelten Stokes-Verschiebungen der Verbindungen **22** und **23** liegen, ausgedrückt als Wellenlängendifferenz, zwischen 115 und 166 nm. Eine Angabe als Wellenzahl, proportional zur Energie der Strahlung, ergibt Werte zwischen 5535 und 7833  $\text{cm}^{-1}$ . Diese große Differenz ermöglicht die Wahl einer Anregungswellenlänge, die nicht vom Emissionsspektrum überlagert wird, wobei die Breite des Absorptions- und Emissionssignals diese Auswahl wiederum einschränkt.

**Tabelle 4-3:** Emissionsmaxima<sup>a</sup> ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ ) und Stokes-Verschiebungen der Verbindungen **22** und **23**

Verbindungen <b>22</b> und <b>23</b>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ [nm]	Stokes' Shift [nm]	Stokes' Shift [ $\text{cm}^{-1}$ ]
<b>22a</b>	H	H	506	132	6975
<b>22b</b>	4-CF <sub>3</sub>	H	494	117	6282
<b>22c</b>	4-NO <sub>2</sub>	H	499	108	5535

**Tabelle 4-3:** Emissionsmaxima<sup>a</sup> ( $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ ) und Stokes-Verschiebungen der Verbindungen **22** und **22** (Fortsetzung)

Verbindungen 22 und 23	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ [nm]	Stokes' Shift [nm]	Stokes' Shift [cm <sup>-1</sup> ]
<b>22d</b>	2-Br	H	478	114	6552
<b>22f</b>	4-Br	H	511	133	6886
<b>22g</b>	4-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	548	163	7726
<b>22h</b>	4-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	518	141	7220
<b>22i</b>	2-Cl	H	479	115	6596
<b>22j</b>	4-I	H	517	137	6973
<b>22k</b>	4-CH <sub>3</sub>	H	519	142	7257
<b>22l</b>	4-OCH <sub>3</sub>	H	547	163	7760
<b>22m</b>	3,5-Cl	H	500	121	6385
<b>22n</b>	3-OCH <sub>3</sub>	H	524	148	7512
<b>22r</b>	2-CH <sub>3</sub>	H	476	117	6847
<b>22s</b>	2-OCH <sub>3</sub>	H	518	149	7795
<b>22u</b>	2-OCH <sub>3</sub>	I	521	150	7833
<b>22v</b>	2-Cl	I	490	134	7682
<b>22w</b>	4-CH <sub>3</sub>	I	523	144	7265
<b>23a</b>	H	H	568	165	7208
<b>23b</b>	3-OCH <sub>3</sub>	H	570	166	7209
<b>23c</b>	2-OCH <sub>3</sub>	H	540	145	6798

<sup>a</sup> Anregung mit der Wellenlänge im jeweils langwelligsten Absorptionsmaximum.

Im Vergleich der Verbindungen **22** erscheint das Fluoreszenzsignal bei *para*-Substitution des *N*-Phenylrestes mit Alkoxy substituenten (**22g** und **l**) am weitesten bathochrom verschoben. Durch einen +M-Effekt stehen diese Substituenten in Mesomerie zum Aromaten und vergrößern als Elektronendonatoren das konjugierte System. Die dadurch vereinfachte Anregbarkeit drückt sich neben einer energieärmeren Absorptionsstrahlung in einem langwelligeren Fluoreszenzsignal aus. Elektronenschiebende Substituenten mit +I-Effekt in *para*-Position (**22k**) verursachen eine geringe Rotverschiebung.

Halogensubstituenten üben sowohl einen +M-Effekt als auch einen –I-Effekt auf den Aromaten, an den sie gebunden sind, aus. Bei den Verbindungen **22f** und **j** bewirkt der +M-Effekt eine leicht bathochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums.

Die kurzwelligsten Fluoreszenzmaxima sind bei Borverbindungen mit *ortho*-Substitution des *N*-Phenylrestes (**22d**, **i** und **r**) zu finden. Analog zur hypsochromen Verschiebung der Absorptionswellenlänge kann hier die sterische Hinderung der freien Drehbarkeit des Phenylringes Einfluss haben. Sie verhindert die planare Ausrichtung des Aromaten zum restlichen Molekül und damit die optimale Konjugation delocalisierter  $\pi$ -Elektronen. Diese können nur unter erhöhtem energetischen Aufwand angeregt werden und geben dementsprechend energiereichere Fluoreszenzstrahlung ab. Abweichend hiervon erzeugt die *ortho*-Methoxygruppe einen leichten bathochromen Effekt, der im starken +M-Effekt begründet sein kann und den energetisch negativen Effekt der eingeschränkten Planarität des Moleküls überwiegt.

Eine leicht hypsochrome Verschiebung des Emissionssignals tritt außerdem bei dem *para*-Nitro- und dem *para*-Trifluormethylderivat **22b** und **c** auf. Beide Substituenten verringern durch einen –I-Effekt, der im Fall des Nitrosubstituenten durch einen –M-Effekt unterstützt wird, die Elektronendichte im Molekül. Ein dadurch energiereicherer Anregungszustand kann die kürzere Emissionswellenlänge erklären. Auffällig hierbei ist jedoch, dass nicht gleichzeitig eine energiereichere Wellenlänge zur Anregung benötigt wurde. Die *para*-Nitroverbindung **22b** lässt sich durch langwelligere Strahlung anregen, während die *para*-Trifluormethylverbindung **22c** nahezu das gleiche Absorptionsmaximum wie die unsubstituierte Verbindung **22a** aufweist.

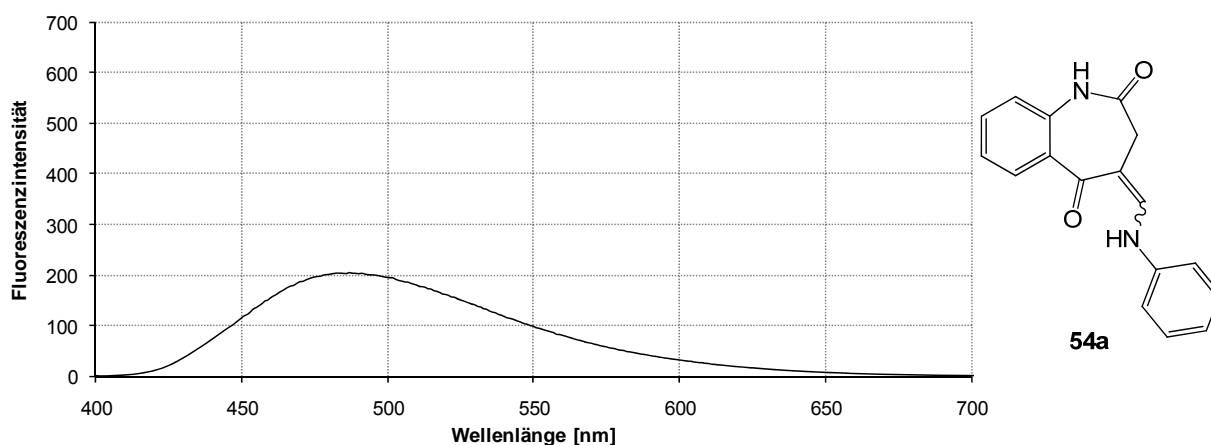
Allgemein liegen die Fluoreszenzmaxima der am Benzazepinrest mit Iod substituierten Verbindungen **22u**, **v** und **w** bei längeren Wellenlängen als die der analogen Verbindungen **22s**, **i** und **k** ohne Rest R<sup>2</sup>. Eine erweiterte Konjugation der  $\pi$ -Elektronen durch den +M-Effekt des Iodatoms kann diesen Effekt verursachen.<sup>128</sup>

Die Diphenylborverbindungen **23** erzeugen Emissionssignale mit stark bathochrom verschobenen Wellenlängen im Vergleich zu den analogen Difluorborverbindungen **22**. Die geringere Elektronegativität der Phenylreste im Gegensatz zu den Fluorsubstituenten am Boratom erzeugt einen verminderten Elektronenzug am gesamten Molekül und kann so eine Erklärung für diese Verschiebung liefern.

Um möglichst viel Lichtenergie der fluoreszierenden Proben zu erfassen, wurde die Spaltbreite des Emissionsmonochromators möglichst groß, zur optimalen Wellenlängenauflösung dagegen so eng wie nötig gewählt. Da für jede Substanz eine individuelle Spaltbreite gewählt wurde und Empfindlichkeitseinstellungen verändert wurden, können die Fluoreszenzintensitäten nicht direkt verglichen werden.

### 4.2.3 Emissionseigenschaften im Vergleich

Das Fluoreszenzspektrum des Enaminons **54a** weist ebenfalls ein sehr breites Fluoreszenzsignal im sichtbaren Wellenlängenbereich auf (Abb. 4-10), dessen Maximum allerdings im Vergleich zu den Borkomplexen **22a** und **23a** stark hypsochrom verschoben ist.



**Abbildung 4-10:** Fluoreszenzspektrum der Verbindung **54a** in Acetonitril (Exzitationswellenlänge 386 nm)

Bereits in den Absorptionsspektren tritt das langwelligste Maximum des Enaminons **54a** bei kürzeren Wellenlängen auf als das Maximum des Diphenylborkomplexes **23a**. Dagegen zeigt der Difluoroborkomplex **22a** einerseits ein energiereicheres Absorptionsmaximum und emittiert andererseits eine energieärmere Strahlung als das Enaminon **54a**. Möglicherweise verliert die Verbindung **22a** nach Anregung über strahlungslose Deaktivierung mehr Energie als das Enaminon **54a**, so dass im Vergleich ein energiereicheres Anregungs-, aber gleichzeitig ein energieärmeres Emissionsmaximum resultiert.

Insgesamt zeigt sich für die Borverbindungen **22** und **23** ein weitaus größerer Wert für die Stokes-Verschiebung, da beim Enaminon **54a** sowohl die Rotverschiebung des Absorptions- als auch die Blauverschiebung des Emissionsmaximums die Differenz zwischen diesen Wellenlängen verringert (Tab. 4-4).

**Tabelle 4-4:** Emissionsmaxima<sup>a</sup> ( $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ ) und Stokes-Verschiebungen der Verbindungen **22a**, **23a** und **54a**

Verbindungen	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ [nm]	Stokes' Shift [nm]	Stokes' Shift [cm <sup>-1</sup> ]
<b>22a</b>	506	132	6975
<b>23a</b>	568	165	7208
<b>54a</b>	486	100	5331

<sup>a</sup> Anregung mit der Wellenlänge im jeweils langwelligsten Absorptionsmaximum.

Die Weiterentwicklung der Enaminone **54** zu den Borverbindungen **22** und **23** ergab in spektroskopischer Hinsicht positive Effekte. Insbesondere erweist sich die starke Vergrößerung der Stokes-Verschiebung für die störungsfreie Emissionsdetektion als sehr vorteilhaft.

#### 4.2.4 Quantenausbeute

In der Entwicklung von Fluorophoren wird vor allem eine große Quantenausbeute  $\Phi_F$  als Fluoreszenzeigenschaft angestrebt. Sie beschreibt die Fähigkeit einer Substanz, absorbierte Strahlung in Fluoreszenzlicht umzuwandeln und wird als Quotient aus absorbierten zu emittierten Photonen ausgedrückt. Bei einer hohen Quantenausbeute ist zur Erzeugung einer ausreichenden, messbaren Fluoreszenzintensität eine vergleichsweise geringe Anregungsenergie nötig.

Positiv wirkt sich eine hohe Quantenausbeute u.a. bei Fluoreszenzmarkern aus, die in lebenden Zellen eingesetzt werden. Die Exzitationsstrahlung wird dabei zu einem intensiven Fluoreszenzsignal umgewandelt, das neben einer eventuell auftretenden Hintergrundfluoreszenz eindeutig detektiert werden kann. Außerdem werden die Zellen durch die für die Fluoreszenzemission erforderliche niedrige Energiezufuhr wenig belastet. Zusätzlich sollten die Substanzen dafür einen großen molaren Absorptionskoeffizienten  $\varepsilon$  aufweisen. Häufig besitzen fluoreszierende Substanzen allerdings eine geringe Quantenausbeute und das Verhalten neuentwickelter Moleküle kann in Bezug auf diese Eigenschaft bisher nicht vollständig vorausgesagt werden.

Neben der Molekülstruktur wirken sich auch Umgebungseinflüsse auf die Quantenausbeute aus. Hohe Temperaturen und niedrige Lösungsmittelviskosität verringern die Fluoreszenzintensität, da sie die strahlungslose Deaktivierung angeregter Zustände im

Molekül begünstigen. In dem als *external conversion* bezeichneten Vorgang führt eine verstärkte Beweglichkeit der angeregten Moleküle zu einer vermehrten Kollision mit Lösungsmittelmolekülen. Dabei findet ein Energietransfer vom Fluorophor auf die beteiligten Moleküle statt, der die Anzahl angeregter Verbindungen reduziert.<sup>123</sup>

Zusätzlich können molekularer Sauerstoff und Halogensubstituenten als solche Fluoreszenzquencher auftreten, da sie den *intersystem crossing*-Übergang angeregter Moleküle zum Triplettzustand verstärken und sie so der Fluoreszenzemission entziehen. Paramagnetische Eigenschaften des Sauerstoffs sowie die als *heavy atom effect* beschriebenen Spin-Interaktionen der schweren Halogenatome erhöhen die Übergangsrate zum Triplettzustand.<sup>71,123</sup> Beispiele für Substanzen mit hohen Quantenausbeuten stellen 9,10-Diphenylanthracen (in Cyclohexan  $\Phi_F = 0.95$ ) und Rhodamin-Farbstoffe (Rhodamin 6G in Ethanol  $\Phi_F = 0.94$ ) dar.<sup>129</sup>

Die Quantenausbeute ist direkt und indirekt bestimmbar. Eine direkte Messung dieses Wertes ist mit Hilfe eines Quantenzählers in einem Spektrofluorimeter möglich, der sowohl die eingestrahlt als auch die emittierten Lichtquanten ermittelt. Diese Methode verursacht mit den entsprechenden Geräten nur einen geringen zeitlichen Aufwand. Dagegen benötigt eine indirekte Bestimmung mehrere Arbeitsschritte und ist dadurch stärker fehleranfällig. Sie wird als Vergleichsmessung unter Zuhilfenahme einer Referenzsubstanz mit bekannter Quantenausbeute durchgeführt.

Nach einem Leitfaden der Firma Jobin Yvon Horiba<sup>130</sup> sollte die Quantenausbeute der Borverbindung **22a** auf indirekte Weise bestimmt werden. Von der Referenzsubstanz wird neben einer zur Probe ähnlichen Quantenausbeute eine gleichartige Struktur und Lage des Absorptionsspektrums gefordert, um gleiche instrumentelle Einstellungen und Untersuchungsbedingungen zu ermöglichen.

Die benötigten empfindlichen Einstellungen des Fluorimeters während der bereits durchgeführten Emissionsmessungen ließen auf eine vergleichsweise geringe Fluoreszenzintensität von **22a** schließen. Es wurden daher als Referenzsubstanzen Chininsulfat (**71**) in 0.5-molarer Schwefelsäure ( $\Phi_F = 0.546^{131}$ ) und Natriumsalicylat (**72**) in einmolarer Natronlauge ( $\Phi_F = 0.25^{132}$ ) gewählt (Abb. 4-11). Zur Überprüfung des Messsystems wurde zunächst von diesen Referenzsubstanzen wechselseitig die Quantenausbeute bestimmt.

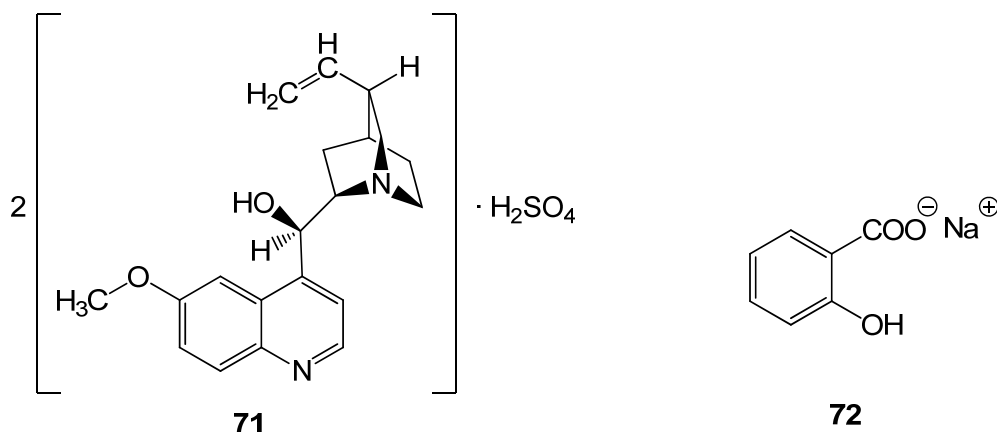


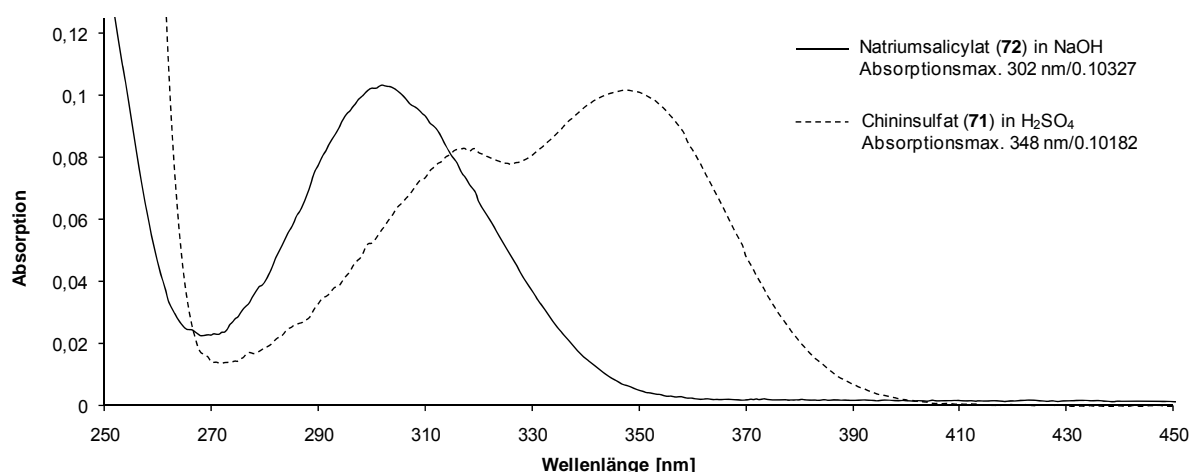
Abbildung 4-11: Chininsulfat (**71**) und Natriumsalicylat (**72**)

Die Referenzsubstanzen wurden jeweils in der Konzentration gelöst, die im Absorptionsspektrum eine maximale Absorption von 0.1 erreichte. Unterhalb einer solchen Konzentration kann davon ausgegangen werden, dass in der Lösung keine Quenchingeffekte durch Selbstabsorption auftreten.<sup>130</sup> Verdünnungsreihen beider Referenzsubstanzen, deren Lösungen maximale Absorptionswerte von 0.08, 0.06, 0.04 und 0.02 aufwiesen, wurden spektroskopisch vermessen.

Anschließend wurde diejenige Wellenlänge ermittelt, bei der Lösungen der zwei Referenzsubstanzen eine identische Absorption zeigen. Diese Anforderung ist bei der Wellenlänge im Schnittpunkt der Absorptionsspektren zweier Lösungen erfüllt. Allerdings kann sich dieser Punkt abhängig von der Absorptionsintensität der Spektren verschieben.

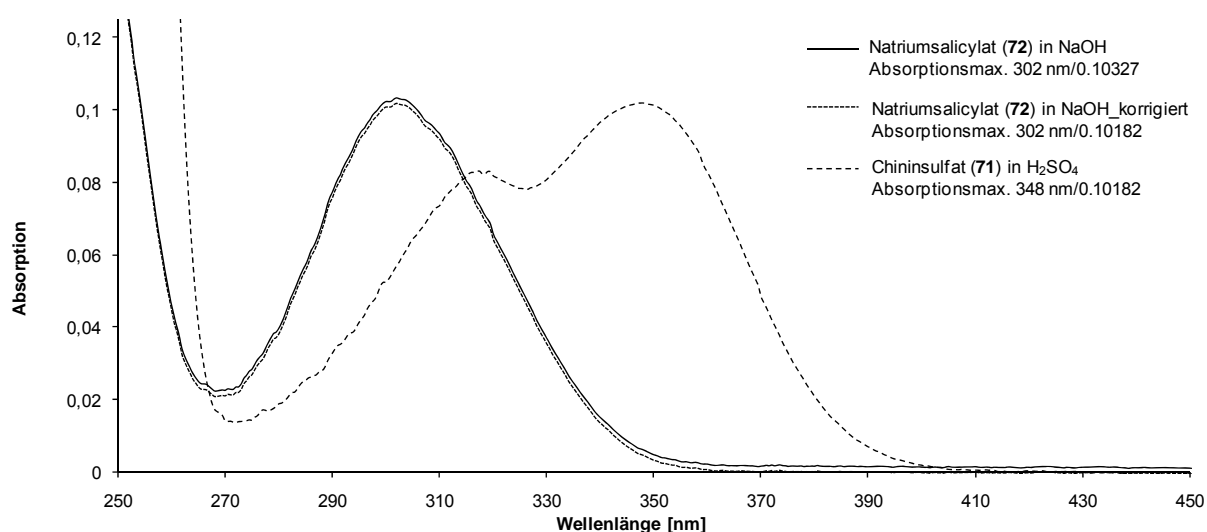
Um einen spezifischen Schnittpunkt festlegen zu können, müssen zwei in ihren Absorptionseigenschaften gleichwertige Lösungen vermessen werden. Dies wird erzielt, indem die Absorptionsmaxima exakt übereinstimmende Werte für die maximale Absorption aufweisen. Eine solche Genauigkeit wurde praktisch nicht erreicht (Abb. 4-12).





**Abbildung 4-12:** Absorptionsspektren von Chininsulfat (71) und Natriumsalicylat (72)

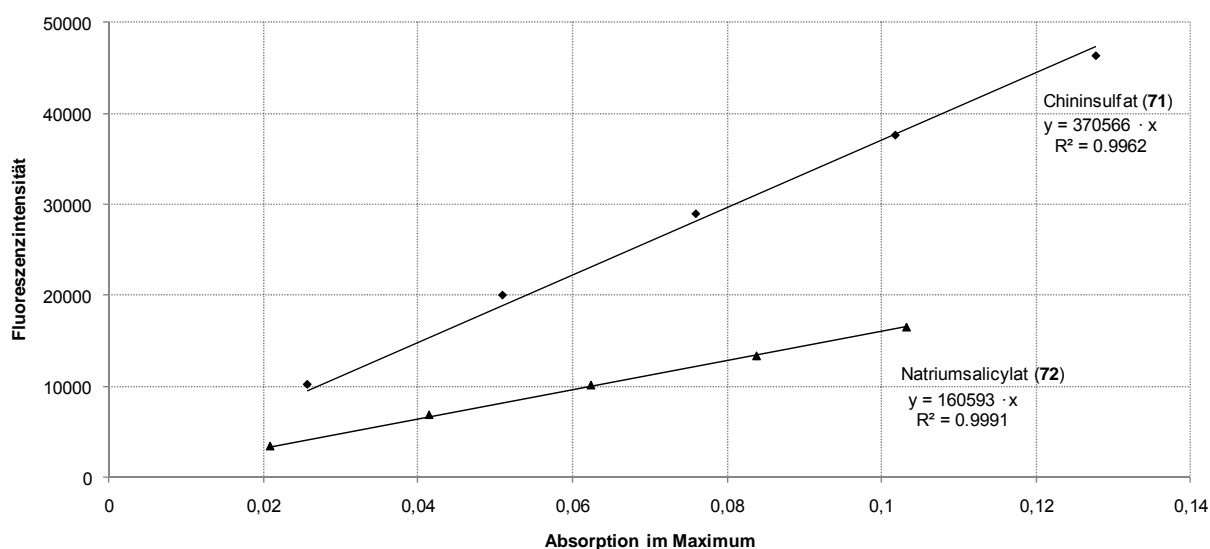
Daher wurde das Natriumsalicylatspektrum manuell in jedem Punkt so verändert, dass die Absorption im Maximum genau dem Absorptionswert der Chininsulfat-Lösung von 0.10182 entsprach (Abb. 4-13).



**Abbildung 4-13:** Absorptionsspektren von Chininsulfat (71) und Natriumsalicylat (72) (Original und korrigiert)

Die Lösungen der Referenzsubstanzen weisen durch die Korrektur übereinstimmende Absorptionseigenschaften (gleiche maximale Absorption) auf und bei der Wellenlänge von 315 nm im Schnittpunkt der Spektren kann von der Absorption der identischen Anzahl von Photonen ausgegangen werden.

Durch Anregung mit Hilfe der ermittelten Wellenlänge von 315 nm wurden anschließend die Emissionsspektren aller oben beschriebenen Lösungen unter steter Beibehaltung der Fluorimetereinstellungen erzeugt. Die Flächen unter den Spektren, bei Natriumsalicylat (**72**) von 350 bis 550 nm, bei Chininsulfat (**71**) von 350 bis 610 nm wurden bestimmt, da sie Proportionalität zur Fluoreszenzintensität der jeweiligen Konzentration des Moleküls aufweisen. In einem Diagramm wurden die Absorptionen in den Maxima der jeweiligen Lösungen und die Fluoreszenzintensitäten, die als Flächen berechnet wurden, gegeneinander aufgetragen (Abb. 4-14). Jeder Punkt entspricht folglich dem Verhältnis von aufgenommener Strahlung im Absorptionsmaximum zur emittierten Fluoreszenzintensität.



**Abbildung 4-14:** Fluoreszenzintensität gegenüber der Absorption im Maximum von Natriumsalicylat- und Chininsulfat-Lösungen

Eine Ausgleichsgerade wurde jeweils eingefügt und ihre Steigung  $m$  mit Hilfe der allgemeinen Geradengleichung

$$y = m \cdot x + b$$

bei der  $b$  den y-Achsenabschnitt beschreibt, berechnet. Diese Gerade gleicht Schwankungen hinsichtlich der spektralen Werte einzelner Lösungen aus und beschreibt so das durchschnittliche Verhältnis von absorbierten zu emittierten Photonen für die jeweilige Substanz. Resultierend ergibt sich eine Proportionalität zwischen der Geradensteigung und der Quantenausbeute  $\Phi_F$ . Auf Grund des Einsatzes derselben Messgeräte mit identischen Einstellungen während der Messungen sowie der gleichen

Anregungswellenlänge können die Geraden der zwei Substanzen miteinander verglichen werden.

Die Quantenausbeute wurde berechnet, indem die Proportionalität zwischen der Steigung der Geraden und dem Wert für die Quantenausbeute genutzt wurde. Da nicht im gleichen Lösungsmittel gemessen wurde, mussten die Refraktionsindices  $\eta$  der Lösungsmittel einbezogen werden.

$$\Phi_P = \Phi_{\text{Ref}} \cdot (m_P / m_{\text{Ref}}) \cdot (\eta_P^2 / \eta_{\text{Ref}}^2)$$

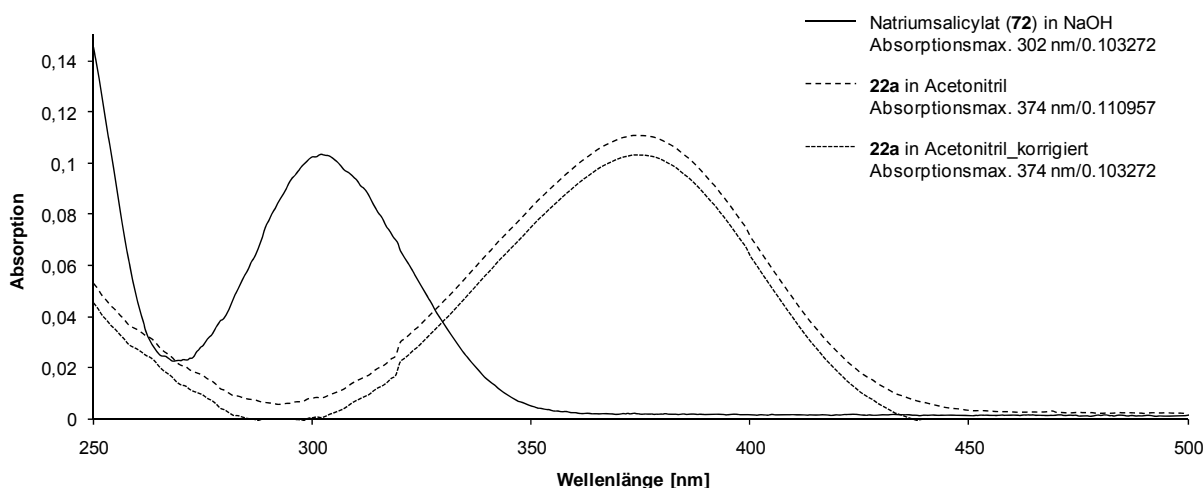
In diesem Fall der Systemüberprüfung waren die Quantenausbeuten beider Referenzsubstanzen (Ref) bekannt. So konnte jede Referenzsubstanz wechselseitig als Probe (P) angesehen werden, ihre Quantenausbeute berechnet und mit dem literaturbekannten Wert verglichen werden. Aus den Werten für die Steigung der Geraden von Natriumsalicylat (**72**) ( $m = 160593$ ) sowie von Chininsulfat (**71**) ( $m = 370566$ ) und die gemessenen Refraktionsindices für die einmolare Natronlauge ( $\eta = 1.343$ ) und die 0.5-molare Schwefelsäure ( $\eta = 1.338$ ) wurden folgende Quantenausbeuten berechnet:

$$\Phi_{\text{Natriumsalicylat}} = 0.546 \cdot (160593 / 370566) \cdot (1.343^2 / 1.338^2) = 0.24$$

$$\Phi_{\text{Chininsulfat}} = 0.25 \cdot (370566 / 160593) \cdot (1.338^2 / 1.343^2) = 0.57$$

Diese Ergebnisse demonstrieren im Vergleich mit den Sollwerten ( $\Phi_{\text{Natriumsalicylat}} = 0.25$  und  $\Phi_{\text{Chininsulfat}} = 0.546$ )<sup>131-132</sup> einen erfolgreichen Einsatz des Messsystems und geringe Abweichungen bei der Bestimmung der Quantenausbeute.

Zur Ermittlung der unbekannten Quantenausbeute wurde von **22a** ebenfalls eine Verdünnungsreihe hergestellt und die Absorptionsspektren der einzelnen Lösungen aufgenommen. Es wurde ein Spektrum von **22a** mit einem Natriumsalicylatspektrum überlagert. Da auch hier nicht die identische Maximalabsorption der Lösungen erzielt worden war, wurde das Spektrum der Verbindung **22a** in jedem Punkt so verändert, dass die Absorption im Maximum derjenigen der Referenzsubstanz in deren Absorptionsmaximum entsprach (Abb. 4-15).



**Abbildung 4-15:** Absorptionsspektren von Natriumsalicylat (**72**) und Verbindung **22a** (Original und korrigiert)

Der Schnittpunkt des Natriumsalicylat- und des korrigierten Spektrums der Verbindung **22a** wurde bei einer Wellenlänge von 330 nm gefunden, die zur Anregung der Fluoreszenzemission eingesetzt wurde.

Die zur Vermeidung von Eigenquenchingeffekten nötigen, geringen Konzentrationen der Verbindung **22a** konnten im Fluorimeter nicht detektiert werden, wenn die Fluorimetereinstellungen der Natriumsalicylatmessungen beibehalten wurden. Dagegen erzeugten die optimalen Geräteeinstellungen der Fluoreszenzermittlung von **22a** übermäßige, nicht quantifizierbare Fluoreszenzsignale für die Natriumsalicylat-Lösungen. Eine Änderung der Messparameter zwischen den Messungen beider Substanzen konnte nicht durchgeführt werden, da so die Vergleichbarkeit der Fluoreszenzintensitäten nicht mehr gegeben war.

Die Quantenausbeute der Verbindung **22a** liegt folglich unterhalb des Wertes von Natriumsalicylat. Da allerdings keine Referenzsubstanzen mit kleineren Werten für  $\Phi_F$  und zu **22a** ähnlichen Absorptionsspektren verfügbar waren, konnte die genaue Bestimmung nicht erfolgen.

Einen möglichen Grund für die geringe Quantenausbeute bei **22a** stellt die strahlungsfreie Deaktivierung des angeregten Moleküls durch Rotation des *N*-Phenylrestes dar. Er zeigt freie Drehbarkeit und verringert dadurch die Abgabe der zur Anregung aufgenommenen Energie als Fluoreszenzemission. Diese freie Drehbarkeit ist bei den Verbindungen **22d**, **i**, **r** und **s** jeweils durch einen *ortho*-Substituenten am Phenylrest

eingeschränkt. Dadurch kann weniger strahlungslose Deaktivierung eintreten, so dass eine höhere Fluoreszenzintensität messbar ist. Auch in diesen Fällen war jedoch die Intensität nicht ausreichend, um über einen Vergleich mit Natriumsalicylat die Quantenausbeute zu bestimmen.

## 5 Biologische Aktivität

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Verbindungen wurden mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren biologisch charakterisiert. Gegenüber isolierten tumorrelevanten Proteinkinasen wurde die inhibitorische Aktivität der Substanzen in verschiedenen Assays ermittelt. Docking-Experimente generierten potentielle Bindungsmodi für zwei neuartige Verbindungen in spezifischen Proteinkinasen.

Bezüglich ihrer antiproliferativen Eigenschaften wurden ausgewählte Substanzen in *in vitro*-Zellassays an einzelnen Tumorzelllinien untersucht. Durch die Anregung zur Fluoreszenzemission konnten in Zelltests untersuchte Borverbindungen zusätzlich intrazellulär durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie visualisiert werden.

Die erzielten Ergebnisse werden im Folgenden erläutert und mit der biologischen Aktivität der Edukte bzw. verwandter Strukturen in Beziehung gesetzt.

### 5.1 Verfahren zur Bestimmung der biologischen Aktivität

#### 5.1.1 Untersuchungen zur Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität

Vertreter sämtlicher dargestellter Verbindungsklassen wurden zunächst hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber 16 rekombinanten tumorrelevanten Proteinkinasen durch die Firma ProQinase GmbH, Freiburg, untersucht. Dazu wurde die prozentuale Restaktivität der einzelnen Kinasen unter Zusatz von 10  $\mu$ M der zu untersuchenden Verbindung bestimmt. Für die am stärksten inhibitorisch wirksamen Substanzen wurden anschließend IC<sub>50</sub>-Profile an den Kinasen erstellt. Der IC<sub>50</sub>-Wert (*inhibitory concentration 50%*) beschreibt diejenige Konzentration einer Verbindung, die eine 50-prozentige Hemmung der Enzymaktivität verursacht. Eine genaue Beschreibung der Methodik sowie die Werte der prozentualen Restaktivitäten der Kinasen bzw. die IC<sub>50</sub>-Werte sind in Kapitel 8.4.1 aufgeführt.

Die Familie der Paullone repräsentiert Strukturen, die vor allem als Hemmstoffe Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) sowie der strukturell eng verwandten Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) bekannt sind.<sup>59,133</sup> Die dargestellten Paullonderivate **20a** und **21a** wurden daher von einer Arbeitsgruppe um L. Meijer (Station Biologique de Roscoff, Frankreich) an der GSK-3, verschiedenen CDKs sowie verwandten Kinasen (CK1,

DYRK1A, CLK1)<sup>12,134</sup> getestet und ihre IC<sub>50</sub>-Profile bestimmt. In Kapitel 8.4.2 ist die Durchführung des Assays erläutert und eine Übersicht über die IC<sub>50</sub>-Werte gegeben. Die auf dem Benzazepin-Grundkörper der Paullone basierenden Verbindungen **17** und **18** zeigen strukturelle Ähnlichkeit zu Furanderivaten, die von Coumar et al.<sup>78</sup> als Aurora A-Kinaseinhibitoren entwickelt worden waren. Zur Bestimmung eines möglichen Bindungsmodus' wurde die Verbindung **17** in die ATP-Bindetasche der Aurora A (PDB ID: 3fdn)<sup>135</sup> sowie der Kinasen IGF-1R (PDB ID: 2zm3)<sup>136</sup> und SRC (PDB ID: 2bdf)<sup>137</sup> gedockt. Zusätzlich sollte die räumliche Ausrichtung des entwickelten 1-Azapauillons **21a** in der Bindetasche der GSK-3 $\beta$  (PDB ID: 1q3w)<sup>15</sup> durch Docking ermittelt werden. Die Docking-Untersuchungen wurden von Dr. Lutz Preu (TU Braunschweig) durchgeführt.

### 5.1.2 Untersuchungen zur antiproliferativen Aktivität

Die Verbindungen **15** und **17** wurden im *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) des *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA) auf ihre antiproliferative Aktivität gegenüber ca. 60 humanen Tumorzelllinien untersucht. Eine genaue Beschreibung des Assays sowie die vollständigen Ergebnisse finden sich im Experimentellen Teil, Kapitel 8.4.3.

Die antiproliferative Aktivität der Paullonderivate **20a** und **21a** sowie der Borkomplexe **22g** und **22r** wurde gegenüber der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 und der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 bestimmt. Die Durchführung dieser Assays sowie die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte sind im Experimentellen Teil, Kapitel 8.4.4 beschrieben.

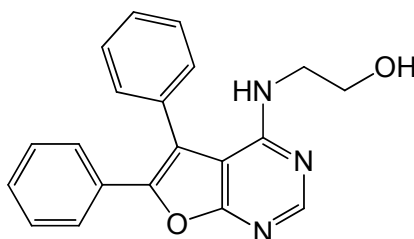
Zur Ermittlung der Zellgängigkeit und der intrazellulären Verteilung wurden die zur Fluoreszenz anregbaren Borverbindungen **22g**, **22r** und **22u** mit HT-29-Zellen inkubiert und anschließend Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der Zellkultur angefertigt.

## 5.2 Biologische Aktivität der Furo[3,2-*d*][1]benzazepinone **17** und **18** sowie der Halbketal-Derivate **15** und **16**

### 5.2.1 Proteinkinase-inhibitorische Eigenschaften der Verbindungen **15**, **16**, **17** und **18**

Die auf der *d*-anellierten 1-Benzazepinon-Struktur der Paullone basierenden Furo[3,2-*d*][1]benzazepinone **17** und **18** sowie ihre Halbketal-Vorstufen **15** und **16** sollten

hinsichtlich ihrer Proteinkinase-inhibitorische Aktivität untersucht werden. Sie ähneln in ihrem Diphenylfuran-Grundkörper der Furanopyrimidin-Struktur **19**. Diese wurde in einem Screening zur Identifikation potentieller Aurora A-Inhibitoren von Coumar et al. mit einem  $IC_{50}$ -Wert gegenüber Aurora A von 309 nM ermittelt.<sup>78</sup>



**19**

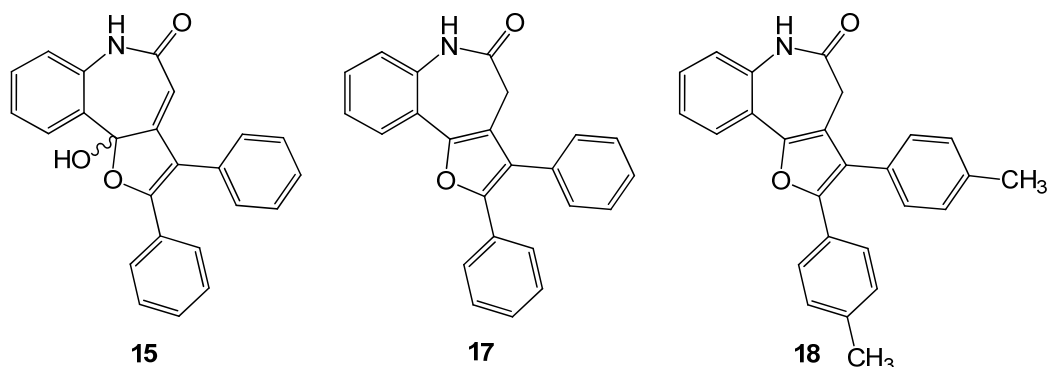
Abbildung 5-1: Aurora A-Kinaseinhibitor mit Furanopyrimidin-Struktur **19**

Zum Erhalt der inhibitorischen Aktivität der Verbindung **19** wurde die Diphenylsubstitution als essentielles Strukturelement identifiziert. In einigen Fällen führte eine Substitution in Position 4 des jeweiligen Phenylrestes zu einer weiteren Verstärkung der Aurora A-Kinaseinhibition. Zusätzlich wurde eine Hemmung der FLT3-Kinase gefunden<sup>78</sup> und bereits in früheren Untersuchungen war diese Struktur als moderater Inhibitor der Kinasen CHK1 und CDK1 identifiziert worden.<sup>138</sup> Bei der Untersuchung der kinaseinhibitorischen Aktivität der Verbindungen **15**, **16**, **17** und **18** sollte daher ein besonderer Fokus auf der Hemmung der Aurora-Kinasen liegen.

In einem Assay an 16 tumorrelevanten Proteinkinasen wurden die  $IC_{50}$ -Werte der Verbindungen **15**, **17** und **18** von der Firma ProQinase GmbH, Freiburg bestimmt. Das Halbketal **16** hatte in einem vorhergehenden Screening keine signifikante Aktivität bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M gegenüber den Enzymen gezeigt.



**Tabelle 5-1:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **15**, **17** und **18** an ausgewählten Kinasen<sup>a</sup>



Verbindungen	ALK	Aurora-B	AXL	FAK	IGF-1R	SRC	VEGF-R2
<b>15</b>	36	51	43	22	15	14	25
<b>17</b>	6.2		27	14	3.8	2.7	15
<b>18</b>	3.3		9.4	7.5	3.5	2.5	7.8

<sup>a</sup> Fehlende Werte stehen für IC<sub>50</sub>-Werte > 100 μM.

Die Verbindungen sind in der Lage mehrere Kinasen bei einer niedrig-mikromolaren Konzentration zu 50% zu inhibieren. IC<sub>50</sub>-Werte unterhalb von 10 μM wurden an den Kinasen ALK, AXL, FAK, IGF-1R, SRC sowie VEGF-R2 erzielt. Es handelt sich daher, im Gegensatz zu der als selektiver Aurora A-Inhibitor beschriebenen Furanopyrimidin-Struktur **19**, um Multikinase-Inhibitoren. An der Aurora-Kinase wies nur **15** (IC<sub>50</sub>: 51 μM) eine Inhibition unter 100 μM auf, allerdings wurde im Kinasepool Aurora B statt Aurora A eingesetzt.

Die ermittelten Werte beschreiben eine Verbesserung der kinaseinhibitorischen Aktivität durch Reduktion des Halbketals **15** zum Furanderivat **17**. Zum Teil sind die mikromolaren IC<sub>50</sub>-Werte um ca. das Sechsfache reduziert. Die freie Hydroxylgruppe besitzt daher bei der Bindung von **15** in die katalytische Tasche der Proteinkinasen einen negativen Einfluss auf die Aktivität, der möglicherweise durch sterische Effekte ausgelöst wird. Eine zusätzliche Verbesserung der IC<sub>50</sub>-Werte wird dagegen durch die 4-Methylsubstitution der Verbindung **18** erzielt, deren IC<sub>50</sub>-Werte bei allen hier aufgeführten Kinasen unter 10 μM liegen und zum Teil im Vergleich zur nicht-methylierten Verbindung **17** auf mehr als die Hälfte reduziert sind. Durch die 4-Methylsubstitution stellen die Phenylreste von **18** vergrößerte hydrophobe Teilstrukturen dar. Eine räumliche Orientierung der Verbindung analog zu einer der im Folgenden

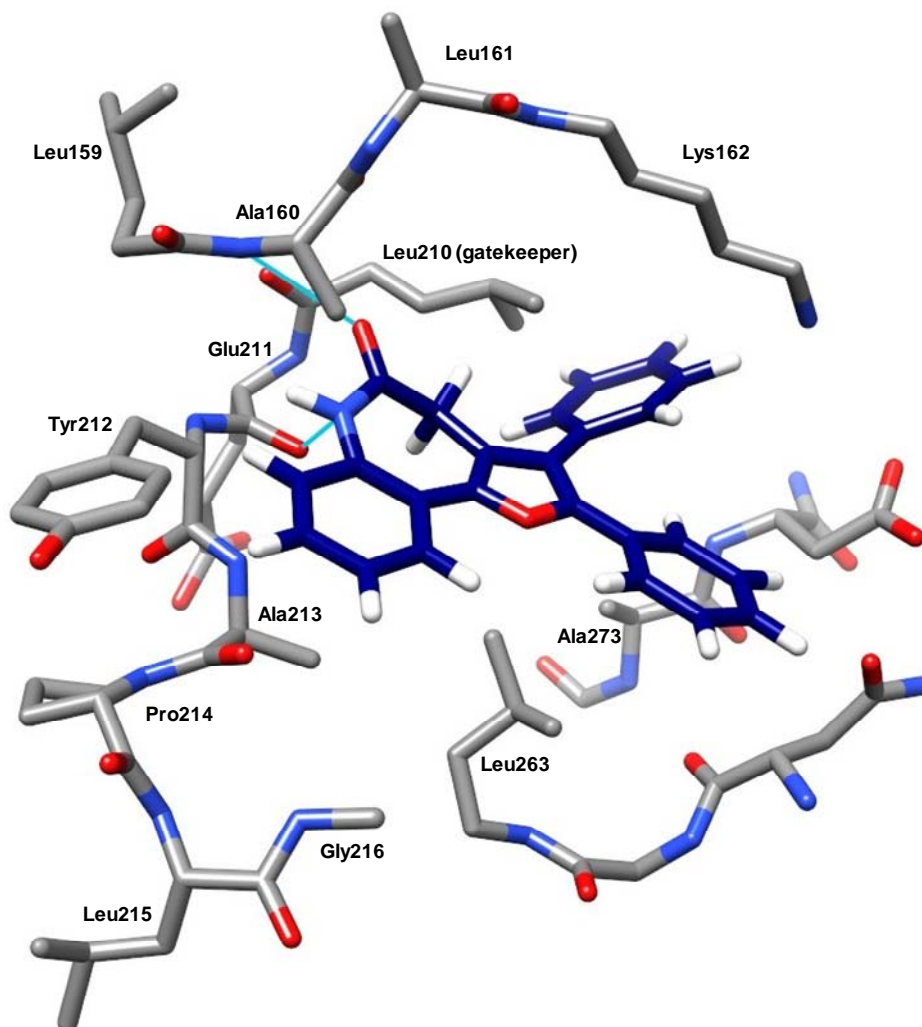
beschriebenen Docking-Posen von **17** würde einen der 4-Methylphenylreste in die Bindetasche hineinragen lassen. Verstärkte hydrophobe Wechselwirkungen mit dem 4-Methylphenylrest in diesem Bereich der jeweiligen Kinase würden eine erhöhte inhibitorische Aktivität erklären.

### 5.2.2 Docking-Studien mit **17** in Aurora A, IGF-1R und SRC

Trotz struktureller Ähnlichkeit zu dem von Coumar et al. als Aurora A-Inhibitor entwickelten Furanopyrimidin **19** liegen die  $IC_{50}$ -Werte der Diphenylfuranderivate **17** und **18** gegenüber der stark homologen Aurora-Isoform B oberhalb von 100  $\mu$ M. Zur Ermittlung eines potentiellen Bindungsmodus wurde die Struktur **17** in eine Kristallstruktur der Aurora A gedockt. Zusätzlich wurde eine mögliche Orientierung von **17** in den ATP-Bindetaschen der am stärksten inhibierten Kinasen IGF-1R und SRC untersucht. Mit dem Vergleich der Docking-Posen wurde eine Erklärung für die unterschiedliche inhibitorische Aktivität von **17** gegenüber den einzelnen Kinasen angestrebt.

#### Potentieller Bindungsmodus von **17** in Aurora A

Da die Röntgenkristallstruktur der Aurora A mit dem Furanopyrimidin **19** (PDB ID: 3k5u)<sup>78</sup> zum Zeitpunkt der Docking-Studie noch nicht über die PDB (*RCSB Protein Data Bank*)<sup>139</sup> verfügbar war, wurde auf eine vorhergehende Aurora A-Kristallstruktur von Coumar et al. zurückgegriffen (PDB ID: 3fdn)<sup>135</sup>. Mit Hilfe des Docking-Programms ArgusLab 4.0.1 (Mark A. Thompson, Planaria Software LLC, Seattle, WA, USA)<sup>140</sup> wurde **17** nach Entfernung des ursprünglichen Liganden in die ATP-Bindetasche der Kristallstruktur gedockt. Die Parametereinstellungen sind im Experimentellen Teil, Kapitel 8.4.6 beschrieben.



**Abbildung 5-2:** Docking-Pose von **17** in der Bindetasche der Aurora A (PDB ID: 3fdn)<sup>135</sup>; Wasserstoffbrücken sind in hellblauer Farbe dargestellt

In der ermittelten Docking-Pose bindet das Furanderivat **17** ebenso wie das Furanopyrimidin **19** an die Hinge-Region der Aurora A (Leu210 bis Gly216). Hierbei kann eine Wasserstoffbrücke zwischen der NH-Gruppe der Lactamstruktur und der *backbone*-Carbonylgruppe von Glu211 in der Hinge-Region beschrieben werden. Außerdem ist die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke vom Carbonylsauerstoffatom der Lactamstruktur zum *backbone*-NH der Aminosäure Ala160 darstellbar. Damit folgt die Verbindung **17** mit der Benzazepinon-Struktur dem Verlauf der Hinge-Region. Docking-Ergebnisse und die Kristallstruktur 1q3w beschreiben eine ähnliche Lage von Paullonstrukturen in der ATP-Bindetasche von Proteinkinasen.<sup>15,54</sup>

Das Programm UCSF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco)<sup>16</sup>, mit dem die Docking-Posen visualisiert wurden, verwendet abhängig vom Donor-Akzeptor-Paar unterschiedliche

geometrische Kriterien für die Abbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen, die auf Untersuchungen von Mills et al. basieren.<sup>141</sup> Allerdings wurden die hier dargestellten Wasserstoffbrücken erst durch sehr hohe Toleranzparameter von 0.8 Å und 67 ° (empfohlene Toleranzen: 0.4 Å und 20 °)<sup>141</sup> für diese festgelegten Kriterien erzeugt.

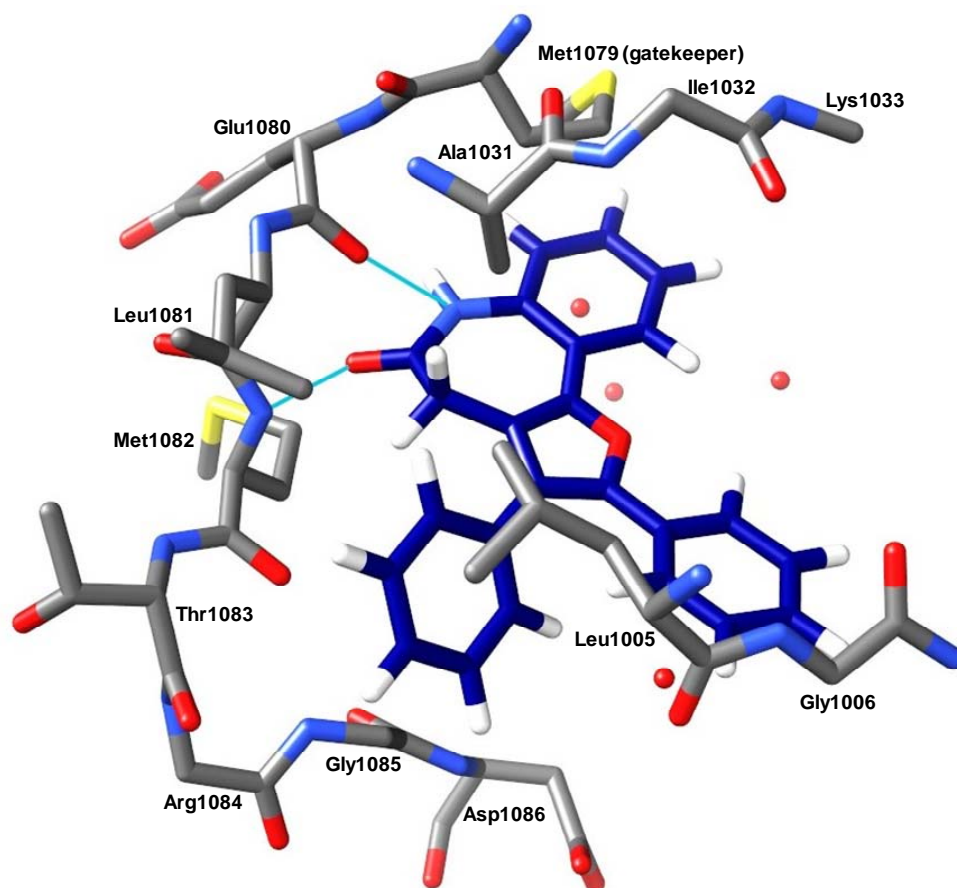
Die Verbindung **17** wird zusätzlich durch hydrophobe Wechselwirkungen in die Bindetasche eingebettet. Der Benzanelland liegt oberhalb der Seitenkette von Ala213, während sich der Phenylrest an Position 3 des Furanringes in die Bindetasche hinein, in Richtung der Seitenkette des Lys162 erstreckt und dabei mit dem Leu210 (*gatekeeper*) interagieren kann. Der zweite Phenylrest in Position 2 des Furanringes liegt oberhalb von Leu263 und Ala273 und zeigt in den Lösungsmittel-zugänglichen Bereich im vorderen Teil der Bindetasche.

Die IC<sub>50</sub>-Werte von > 100 µM für **17** und **18** sowie von 51 µM für **15** wurden für Aurora B bestimmt. Auf Grund einer hochkonservierten Aminosäuresequenz der ATP-Bindetasche der Aurora-Isoformen können IC<sub>50</sub>-Werte ähnlicher Größenordnung für Aurora A angenommen werden. Diese geringe inhibitorische Aktivität kann möglicherweise mit einer ungünstigen Orientierung der Verbindung **17** zur Ausbildung geeigneter Interaktionen mit der Kinase erklärt werden. Hierauf lassen die hohen benötigten Toleranzparameter zur Darstellung der Wasserstoffbrücken schließen.

### Potentieller Bindungsmodus von **17** in IGF-1R und SRC

Für **17** wurden gegenüber SRC und IGF-1R IC<sub>50</sub>-Werte im niedrig-mikromolaren Bereich bestimmt. Die Verbindung **17** wurde zusätzlich in die ATP-Bindetasche dieser Kinasen gedockt, um durch einen Vergleich der ermittelten potentiellen Bindungsmodi in Aurora A, SRC und IGF-1R eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen IC<sub>50</sub>-Werte zu finden.

Abbildung 5-3 stellt die Docking-Lösung für Verbindung **17** in IGF-1R dar, für die die Kristallstruktur mit der PDB ID 2zm3<sup>136</sup> als Grundlage verwendet wurde.



**Abbildung 5-3:** Docking-Pose von **17** in IGF-1R (2zm3)<sup>136</sup>; Darstellung von Wasserstoffbrücken in hellblauer Farbe, rote Kugeln beschreiben Wassermoleküle

In der ATP-Bindetasche des IGF-1R bindet der Benzazepinon-Grundkörper über zwei Wasserstoffbrücken an die Hinge-Region der Kinase. Das Molekül ist hier im Vergleich zum Bindungsmodus in der Aurora A um 180 ° gedreht. Es liegt jeweils eine Wasserstoffbrücke von der *backbone*-Carbonylgruppe des Glu1080 sowie dem *backbone*-NH des Met1082 zur Lactamstruktur vor. Diese zwei Interaktionen zu den Aminosäuren eine (gk+1) bzw. drei Positionen (gk+3) nach dem *gatekeeper* Met1079 (gk) treten auch bei weiteren Inhibitoren des IGF-1R und dem ursprünglich co-kristallisierten Liganden auf.<sup>136,142</sup> Hydrophobe Interaktionen treten unter anderem zwischen Leu1005 bzw. Gly1006 und den Phenylresten sowie zwischen Ala1031 und dem Benzazepinon-Grundkörper auf.

Die Toleranzparameter (0.1 Å und 51 °) zur Darstellung der Wasserstoffbrücken liegen unterhalb der für die Docking-Pose in Aurora A benötigten Werte und sind daher eine

mögliche Erklärung für eine vorteilhaftere Orientierung und stärkere Bindung der Verbindung **17** in der IGF-1R-Bindetasche.

Das Docking von **17** in die Bindetasche der SRC-Kinase wurde unter Verwendung der Kristallstruktur mit der PDB ID 2bdf<sup>137</sup> durchgeführt (Abb. 5-4).

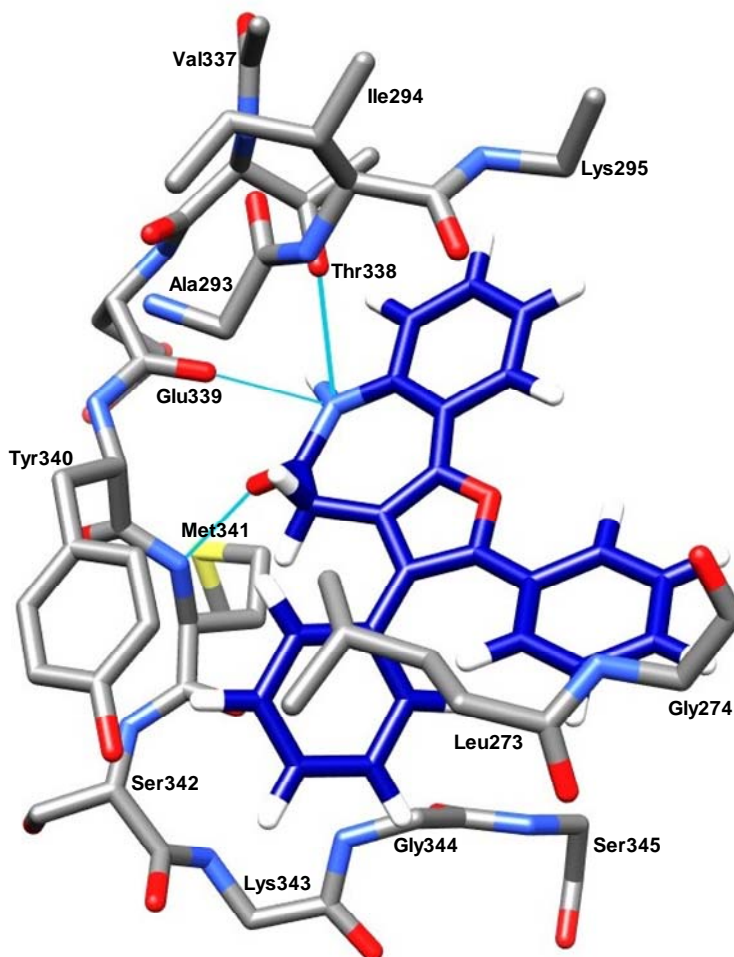


Abbildung 5-4: Docking-Pose von **17** in SRC (PDB ID: 2bdf)<sup>137</sup>; Darstellung von Wasserstoffbrücken in hellblauer Farbe

In der ATP-Bindetasche der SRC-Kinase liegt der Benzazepinon-Grundkörper der Verbindung **17** verglichen mit der Docking-Pose in der Aurora A ebenfalls um 180 ° gedreht vor. Ausgehend von der Lactamstruktur des Benzazepinon-Grundkörpers können drei Wasserstoffbrücken zur Hinge-Region beschrieben werden. Jeweils eine Interaktion zeigt sich zum *backbone* der Aminosäuren eine (Glu339, gk+1) bzw. drei (Met341, gk+3) Positionen vom *gatekeeper* (Thr338, gk) entfernt. Eine dritte Wasserstoffbrücke entsteht zur Seitenkette der *gatekeeper*-Aminosäure Thr338. Für die Darstellung der Wasserstoffbrücken werden Toleranzparameter von 0.4 Å und maximal

53 ° benötigt, die ebenfalls unterhalb der Grenzen für die Darstellung dieser Wechselwirkungen in der Aurora A-Docking-Pose liegen. Hydrophobe Wechselwirkungen entstehen zwischen der Seitenkette des Leu273 und dem Phenylrest in Position 3 des Furanringes.

Einerseits kann durch die Beschreibung einer dritten Wasserstoffbrücke eine verstärkte Bindung des Moleküls **17** an die Kinase und andererseits durch die Beteiligung der *gatekeeper*-Aminosäure Thr338 die Spezifität der Verbindung gegenüber SRC erklärt werden. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung, dass **17** an SRC den niedrigsten IC<sub>50</sub>-Wert aller getesteten Proteinkinasen zeigte.

### 5.2.3 Spezifische Proteinkinasen – Aurora-Kinasen, IGF-1R und SRC

#### Aurora-Kinasen

Die Ser/Thr-Kinasen Aurora A, B und C weisen eine große strukturelle Homologie ihrer katalytischen, C-terminalen Domäne auf (> 70%) und spielen eine essentielle Rolle während der Mitose. Ihr Expressionslevel wird Zellzyklus-abhängig dynamisch reguliert, allerdings erzeugen erst die Bindung an unterschiedliche Cofaktoren und Autophosphorylierungsvorgänge eine vollständige Aktivierung und korrekte Lokalisation der jeweiligen Aurora-Kinase.<sup>143</sup>

Aurora A ist während der G2-Phase sowie zu Beginn der Mitose für die Zentrosomenreifung und -teilung sowie die Ausbildung des Spindelapparates zuständig. Hierfür ist sie an den Zentrosomen sowie an den Mikrotubuli des Spindelapparates lokalisiert. Aurora B wird dagegen von der Metaphase bis zum Ende der Mitose am stärksten exprimiert. Diese Isoform reguliert an den Chromosomen die Chromosomenkondensation sowie die Kohäsion der Schwesterchromatiden. Im weiteren Verlauf der Mitose ist Aurora B im zentralen Bereich des Spindelapparates verantwortlich für die Orientierung der Schwesterchromatiden sowie die Regulation und Kontrolle der korrekten Kinetochorbindung der Chromatiden an die Mikrotubuli des Spindelapparates (*spindle checkpoint kinase*) und die abschließende Zytokinese. Der bislang am wenigsten untersuchten Isoform Aurora C werden ähnliche Aufgaben wie der Aurora B sowie eine wichtige Rolle in der Spermatogenese zugeordnet.<sup>144-145</sup>

Aurora-Kinasen sind in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert und *in vitro* wurde ein dadurch erzeugtes Auftreten von Zentrosomenamplifikation, Chromosomeninstabilität und Polyploidie sowie Verhinderung der Zytokinese nachgewiesen. Auch wenn die neoplastisch transformierenden Eigenschaften der Aurora-Kinasen gering und zur

Tumorgenese zusätzliche onkogene Faktoren notwendig zu sein scheinen, konnte in präklinischen Untersuchungen ein Tumorrückgang durch Aurora-Kinaseinhibitoren gezeigt werden.<sup>78,146</sup>

### IGF-1R

Der IGF-1-Rezeptor (*insulin-like growth factor receptor 1*) spielt als RTK eine zentrale Rolle im IGF-Signalweg, der über die Regulation von Zellwachstum, -differenzierung und -überleben die normale Entwicklung, vor allem während der Embryonalphase, und das Wachstum eines Organismus beeinflusst. Zwei transmembranäre  $\beta$ -Untereinheiten und zwei extrazelluläre  $\alpha$ -Untereinheiten bilden verbunden über Disulfidbrücken das IGF-1R-Tetramer aus.<sup>136,142,147</sup>

Durch Ligandbindung an die Rezeptordomäne der RTK IGF-1R wird eine Konformationsänderung und Autophosphorylierung ausgelöst, die die Aktivität der intrazellulären Kinasedomäne erhöht und Bindestellen für Adapterproteine generiert. Vermittelt durch das rekrutierte Adapterprotein SHC (*SRC homologous and collagen*) wird der MAPK (*mitogen activated protein kinase*- bzw. RAS/RAF/MEK/ERK)-Signalweg aktiviert, der zur Phosphorylierung antiapoptotischer zytoplasmatischer Substrate sowie zur Genexpression führt, wodurch proliferative und ebenfalls antiapoptotische Vorgänge ausgelöst werden. Dagegen verursacht die Bindung des Adapterproteins IRS-1 (*insulin receptor substrate*) den Ablauf des PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*)/AKT-Signalwegs, der zahlreiche Zielstrukturen aktiviert, die ebenfalls das Zellüberleben und die Proteintranslation verstärken.<sup>148</sup>

Eine übermäßige Aktivität des IGF-1R kann zu Tumorentstehung und der verstärkten Apoptosehemmung entarteter Zellen führen und die Metastasierung unterstützen. In einer Vielzahl von Krebserkrankungen wie Brust-, Lungen- und Prostatakrebs, Tumoren des Gastrointestinaltraktes und des ZNS sowie Ovarial- und Endometrialkarzinomen wurde eine Überexpression des IGF-1R oder seiner Liganden festgestellt.<sup>142,148</sup> Eine ca. 80-prozentige Sequenzhomologie der Kinasedomäne zum Insulinrezeptor erschwert die Entwicklung selektiver niedrig-molekularer IGF-1R-Inhibitoren.<sup>142</sup>

### SRC-Kinase

Von der SRC-Kinase wurde zunächst die virale Variante als transformierendes Genprodukt des Rous sarcoma Virus' identifiziert (v-SRC). Die zelluläre Form (c-SRC) dieser nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die durch das humane Proto-Onkogen *c-src*



kodiert wird, wurde 1976 ermittelt. Mit neun stark homologen Enzymen bildet c-SRC die Familie der SRC-Kinasen (SRC *family kinases* [SFK]). Als zytoplasmatische Tyr-Kinase interagiert c-SRC mit vielen über- und untergeordneten Proteinen in unterschiedlichen Signalwegen. Obwohl eine SRC-Überexpression nur geringe Onkogenität zeigt und konstitutiv aktivierende SRC-Mutationen in menschlichen Tumoren selten auftreten, können diese Veränderungen die prokarzinogene Wirkung anderer Moleküle verstärken.<sup>149-150</sup>

Die SRC-Kinase beeinflusst sowohl die fokale Adhäsion von Zellen über transmembranäre Proteine wie Integrine an die extrazelluläre Matrix als auch Zell-Zell-Verbindungen durch adhäsive Cadherin-Catenin-Komplexe. Eine fehlregulierte SRC-Aktivität führt in Folge von verstärkt phosphorylierten Integrin-Untereinheiten zur Destabilisierung der fokalen Adhäsion. Gleichzeitig wird Cadherin sowie die mit diesem Protein verknüpfte FAK (*fokal adhesion kinase*) phosphoryliert, was in einem Funktionsverlust des Cadherin-Catenin-Komplexes resultiert. Insgesamt werden durch diese Mechanismen Zellbewegung, Differenzierung, Invasion und Metastasierung unterstützt. Zusätzlich aktiviert ein Komplex aus SRC und FAK bestimmte Signalwege, die das Zellüberleben fördern.<sup>151</sup>

Außerdem interagiert die SRC-Kinase mit zahlreichen Rezeptor-Tyrosinkinasen (VEGFR, PDGFR, IGF-1R u.a.), wobei sie einerseits deren ausgelöste Signalkaskade reguliert und andererseits die Rezeptoren selber modifiziert. Bei Überaktivierung von SRC können auf diesem Weg Proliferation und Transformierungsvorgänge sowie die Angiogenese verstärkt werden.<sup>151</sup>

#### 5.2.4 Antiproliferative Aktivität der Verbindungen 15 und 17

Da die Verbindungen **15**, **17** und **18** eine gleichzeitige Inhibition mehrerer tumor-relevanter Proteinkinasen, zum Teil mit IC<sub>50</sub>-Werten im niedrig-mikromolaren Bereich zeigten, sollten sie in einem *in vitro*-Assay bezüglich ihrer antiproliferativen Aktivität gegenüber ca. 60 humanen Tumorzelllinien untersucht werden. Dieses Screening wurde mit den Verbindungen **15** und **17** im *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) des *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt. Verbindung **18** wurde wegen hoher Strukturähnlichkeit zu **17** vom NCI nicht als Screeningkandidat akzeptiert. Die eingesetzten Zelllinien können neun verschiedenen Krebsformen oder organspezifischen Tumoren zugeordnet werden. Diese sind Leukämie und Melanome,

Darm-, Nieren-, Prostata- und Ovarialtumore sowie nicht kleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC), Brustkrebs und Tumore des zentralen Nervensystems.<sup>152</sup>

Von jeder Verbindung wurde zunächst ein Balkendiagramm (*one dose mean graph*) erstellt, in dem das prozentuale Zellwachstum jeder Zelllinie nach Inkubation mit der zu untersuchenden Substanz (10  $\mu$ M) sowie das mittlere prozentuale Wachstum aller Zelllinien dargestellt ist.

Hierbei wurde unter Zusatz des Furanderivates **17** ein mittleres Zellwachstum aller Zellen von > 96% festgestellt, so dass dieser Verbindung praktisch keine antiproliferative Aktivität zugeordnet werden kann. Dagegen lag das mittlere Zellwachstum bei Inkubation mit **15** bei weniger als 50%. Die Darmkrebszelllinie HCC-2998 sowie die Melanomzelllinie LOX IMVI proliferierten unter Zusatz von 10  $\mu$ M der Verbindung weniger als 10% im Vergleich zu unbehandelten Zellen (7% bzw. 3%). Gegenüber der Melanomzelllinie SK-MEL-5 konnte sogar ein zytotoxischer Effekt festgestellt werden, der zu einer Abnahme der Zellmasse um mehr als 16% führte. Das Balkendiagramm der Verbindung **15** ist in Abbildung 5-5 dargestellt.

In dieser Darstellung beschreibt die senkrechte Achse, die sich bei 0% befindet, das mittlere Zellwachstum aller Zellen unter Zusatz der zu untersuchenden Verbindung. Dieser Mittelwert liegt im Fall von **15** bei ca. 50%. Für jede Zelllinie ist ein Querbalken angegeben, der das prozentuale Wachstum dieser Zellen im Vergleich zum mittleren Zellwachstum beschreibt (mittleres Zellwachstum [%] - Zellwachstum [%]). Liegt das Wachstum einer Zelllinie unterhalb des Mittelwertes, werden die Zellen also stärker gehemmt, weist der Balken nach rechts. Dagegen zeigt er bei einem Zellwachstum oberhalb des Mittelwertes nach links.

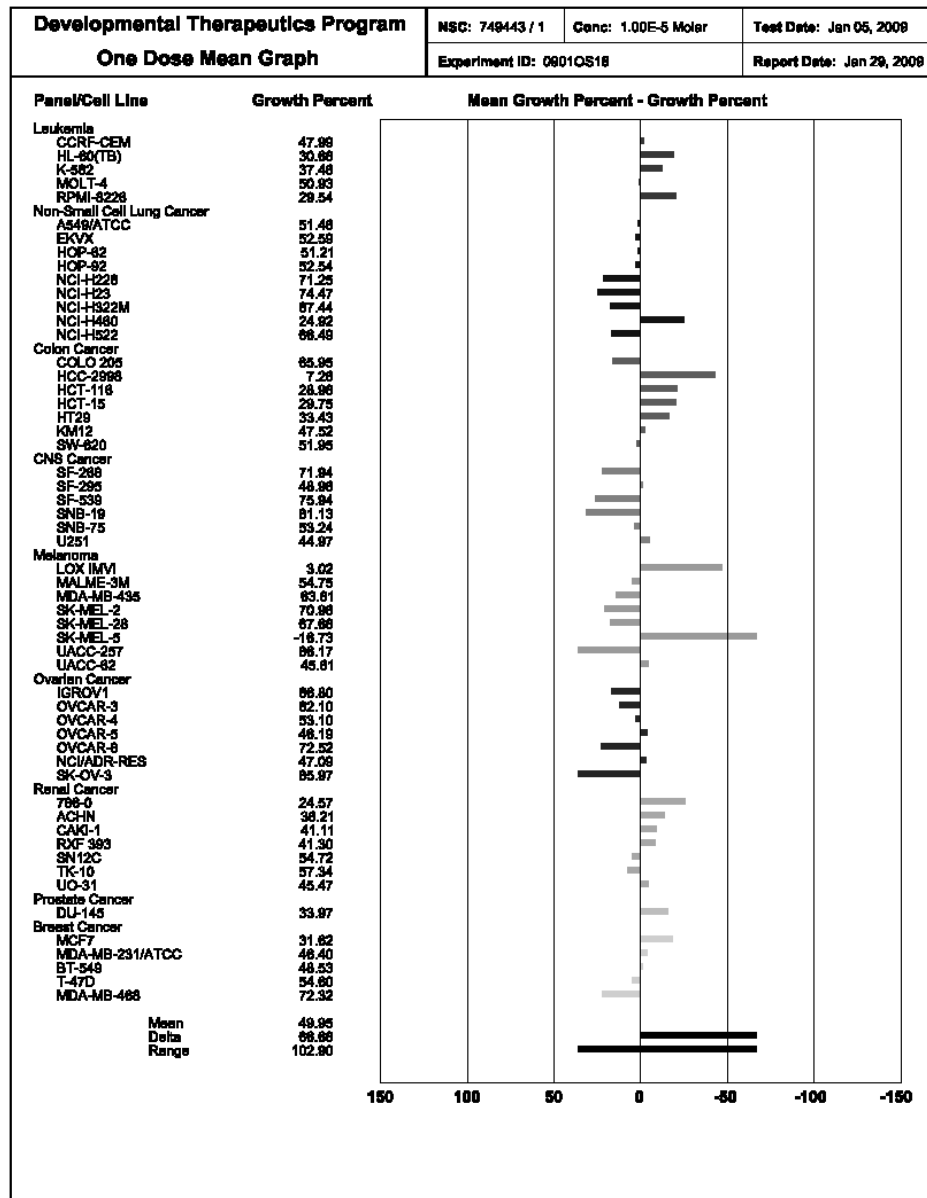


Abbildung 5-5: Balkendiagramm (*one dose mean graph*) von **15**

Auf Grund einer signifikanten, mittleren Wachstumshemmung der Zellen von mehr als 50% wurden für die Verbindung **15** zusätzlich Dosis-Wirkungs-Kurven für jede Zelllinie mit Hilfe fünf verschiedener Substanzkonzentrationen angefertigt. Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven konnten die  $GI_{50}$ -Werte (*growth inhibition 50%*), die TGI-Werte (*total growth inhibition*) und die  $LC_{50}$ -Werte (*lethal concentration 50%*) bestimmt werden. Die  $GI_{50}$ -Werte lagen im mittleren bis niedrig-mikromolaren Bereich und erzielten einen Mittelwert von 7.6  $\mu M$ . Besonders niedrige Werte wurden bei der Nierenkrebs-Zelllinie CAKI-1 (1.86  $\mu M$ ) und der Leukämie-Zelllinie HL-60(TB) (2.41  $\mu M$ ) gemessen.

Graphisch werden die  $GI_{50}$ -Werte ebenfalls in einem Balkendiagramm (*mean graph*) veranschaulicht, das für **15** in Abbildung 5-6 dargestellt ist. Dabei wird jeweils der Wert

des dekadischen Logarithmus des  $GI_{50}$ -Wertes ( $\log_{10}GI_{50}$ ) aufgetragen. Als senkrechte Mittellinie des Diagramms zeigt der *mean graph midpoint* (MG-MID) die durchschnittliche antiproliferative Aktivität der Substanz an.<sup>153</sup>

Querbalken beschreiben mit ihrer Länge die Differenz aus  $\log_{10}MG-MID$  und  $\log_{10}GI_{50}$ -Wert, wobei nach rechts gerichtete Balken auf eine stärkere Hemmwirkung gegenüber einer Zelllinie als der MG-MID-Wert hinweisen. Ein charakteristisches Selektivitätsprofil der antiproliferativen Aktivität kann für die Ermittlung eines möglichen Inhibitionsmechanismus der Substanz genutzt werden. Für die Verbindung **15** konnte ein solches spezifisches Profil nicht ermittelt werden.

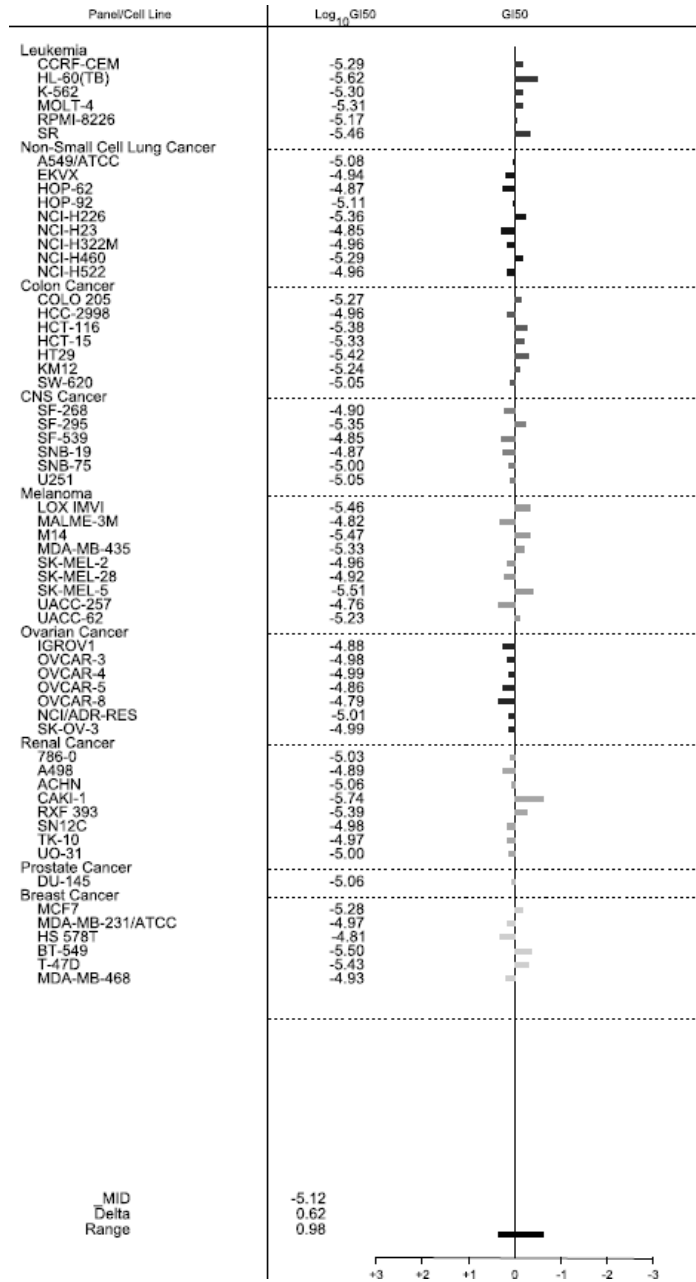


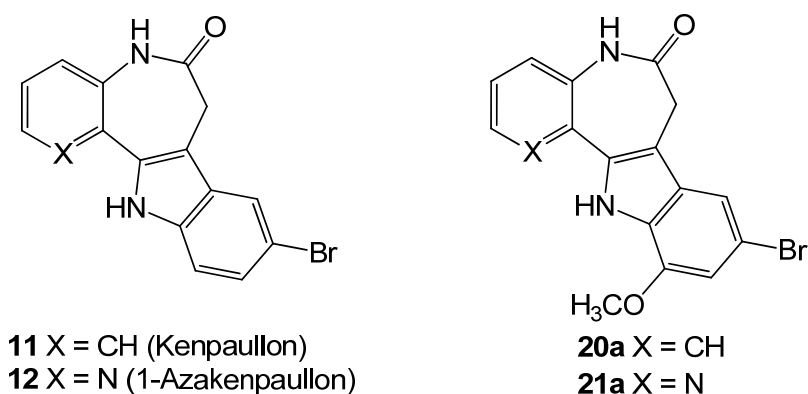
Abbildung 5-6: Balkendiagramm (*mean graph*) von **15**

### 5.3 Biologische Aktivität der 9-Brom-11-methoxy-substituierten Paullonderivate **20a** und **21a**

#### 5.3.1 Proteinkinase-inhibitorische Eigenschaften der Verbindungen **20a** und **21a**

Die Paullonderivate **20a** und **21a** stellen als 11-Methoxyderivate eine Weiterentwicklung der Struktur des Kenpaullons **11** bzw. des 1-Azakenpaullons **12** dar (Abb. 5-7). Kenpaullon **11** weist als potenter Kinaseinhibitor Aktivität gegenüber der Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3,  $IC_{50}$ : 23 nM) und den Cyclin-abhängigen Kinasen CDK1/Cyclin B ( $IC_{50}$ : 0.4  $\mu$ M), CDK2/Cyclin A ( $IC_{50}$ : 0.68  $\mu$ M) und CDK5/p35 ( $IC_{50}$ : 0.85  $\mu$ M) auf.<sup>54-55</sup> Weiterführende Studien ergaben eine Hemmung zusätzlicher Kinasen (PHK, CHK2, PIM3, PAK4-6, SRC und LCK).<sup>154</sup>

1-Azakenpaullon **12** besitzt ebenfalls die Eigenschaften einer dualen Kinaseinhibition der GSK-3 $\beta$  ( $IC_{50}$ : 18 nM) und der CDKs (CDK1/Cyclin B,  $IC_{50}$ : 2.0  $\mu$ M; CDK5/p25,  $IC_{50}$ : 4.2  $\mu$ M) mit einer höheren Selektivität für die GSK-3.<sup>55</sup>



**Abbildung 5-7:** Kenpaullon **11** und 1-Azakenpaullon **12**, 11-Methoxypaullone **20a** und **21a**

Zunächst wurde die kinaseinhibitorische Aktivität und das Hemmprofil der 11-Methoxy-Paullone **20a** und **21a** in einem Assay an 16 tumorrelevanten Proteinkinasen durch die Firma ProQinase GmbH, Freiburg untersucht. In einem Übersichts-Screening wurde jeweils eine Konzentration von 10  $\mu$ M gegenüber den Enzymen eingesetzt. Unter Zusatz von **20a** bzw. **21a** blieb eine Restaktivität der untersuchten Kinasen mit Ausnahme der IGF1-R, PIM1, SRC und VEGF-R2 von > 60% (Tab. 5-2) erhalten. Auffällig ist hierbei, dass das 1-Azaderivat **21a** mit drei Ausnahmen die Proteinkinasen

jeweils zu einem höheren Prozentsatz inhibierte als **20a**. Auf Grund der insgesamt niedrigen inhibitorischen Aktivität wurde auf eine Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte verzichtet.

**Tabelle 5-2:** Prozentuale Restaktivität [%] ausgewählter Proteinkinasen unter Zusatz von **20a** und **21a** [jeweils 10 µM]

Kinasen	20a	21a
<b>IGF1-R</b>	81	59
<b>PIM1</b>	69	40
<b>SRC</b>	49	39
<b>VEGF-R2</b>	63	55

Von der Arbeitsgruppe um L. Meijer (Station Biologique de Roscoff, Frankreich) wurden anschließend die IC<sub>50</sub>-Werte gegenüber verschiedenen CDKs, der GSK-3 und verwandten Kinasen bestimmt. Die Kinasen GSK-3 (GSK-3 $\alpha/\beta$ ), *Pf*GSK-3 als GSK-3-Analogon des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum*, verschiedene CDK/Cyclin-Komplexe (CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A, CDK5/p25, CDK9/Cyclin T) und verwandte Kinasen (CK1, DYRK1A, CLK1) wurden eingesetzt (Tab. 5-3).

**Tabelle 5-3:** IC<sub>50</sub>-Werte [µM] der Paullonderivate **20a** und **21a** gegenüber CDKs und verwandten Kinasen<sup>a</sup>

Kinase	20a	21a
<b>CDK1/Cyclin B</b>	> 10	> 10
<b>CDK2/Cyclin A</b>	> 10	7
<b>CDK5/p25</b>	> 10/> 10	> 10/> 10
<b>CDK9/Cyclin T</b>	4.90	0.52
<b>CK1</b>	> 10/> 10	> 10/> 10
<b>CLK1</b>	> 10	> 10
<b>GSK-3<math>\alpha/\beta</math></b>	7.30/3.30	0.12/0.06
<b><i>Pf</i>GSK-3</b>	> 10	7.00
<b>DYRK1A</b>	> 10	> 10

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte aus zwei voneinander unabhängigen Testungen sind durch einen Schrägstrich getrennt.

Beide Verbindungen weisen ein neuartiges Inhibitionsprofil mit einer bislang für Paullone unbekannten, selektiven Inhibition der GSK-3 und des CDK9/Cyclin T-Komplexes im hier untersuchten Kinasepool auf. Das 1-Azaderivat **21a** hemmt

zusätzlich den CDK2/Cyclin A-Komplex sowie die *Pf*GSK-3. Die  $IC_{50}$ -Werte liegen für **20a** im niedrig-mikromolaren Bereich. Verglichen mit Kenpaullon **11** zeigt **20a** gegenüber den CDKs eine ca. zehnfach niedrigere und gegenüber der GSK-3 eine um den Faktor Hundert verringerte Aktivität. Für die deutlich potentere Verbindung **21a** werden  $IC_{50}$ -Werte im nanomolaren Bereich bestimmt. Die GSK-3 wird jedoch durch das 1-Aza-kenpaullon **12**, verglichen mit **21a**, drei- bis sechsfach stärker inhibiert.

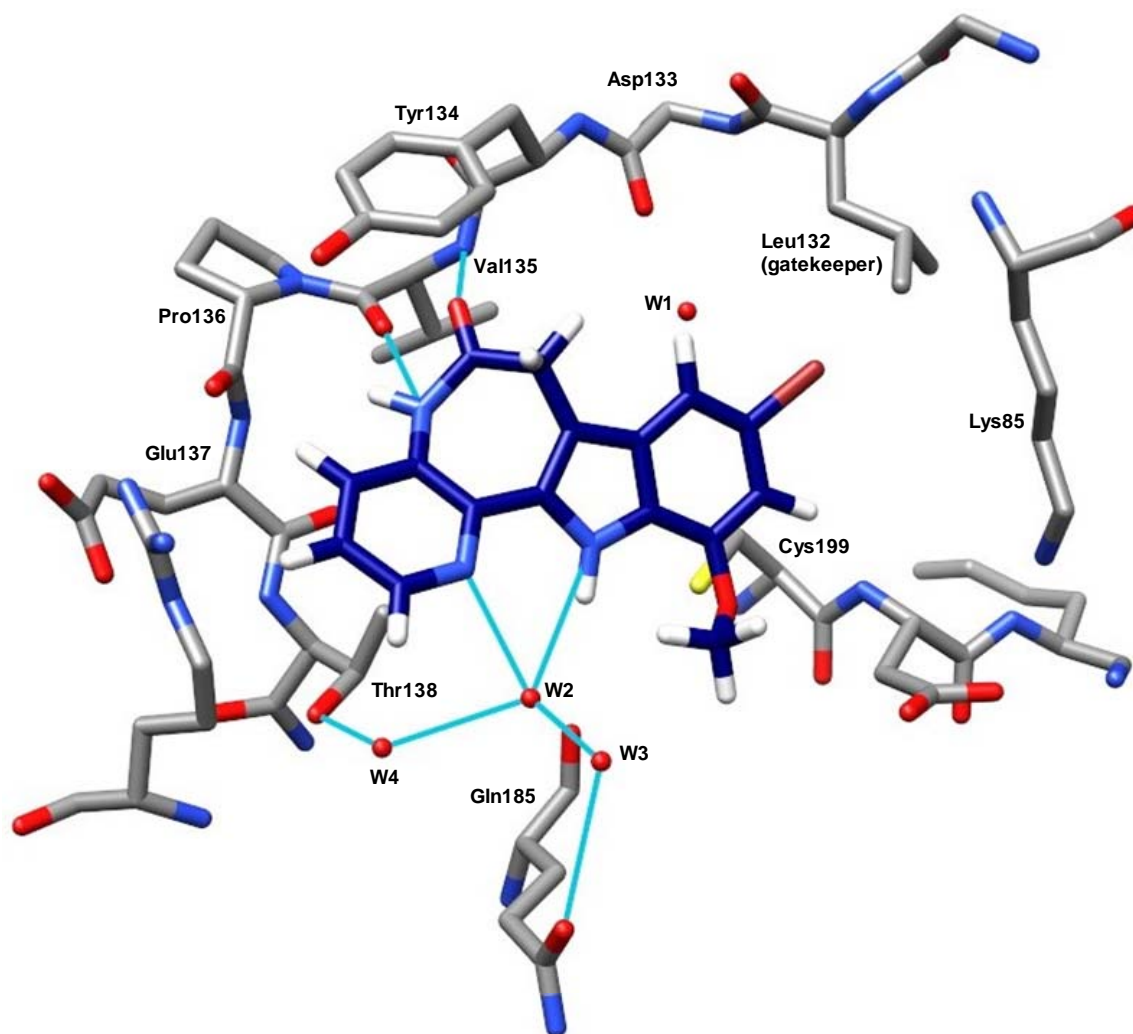
Die Selektivität der Verbindung **12** für die GSK-3 gegenüber der CDK1 liegt bei einem Wert von 111 ( $CDK1\ IC_{50} : GSK-3\ IC_{50}$ ). Für Verbindung **21a** wird dieser Selektivitätsindex auf Grund eines nicht bestimmten  $IC_{50}$ -Wertes für CDK1 ( $> 10\ \mu M$ ) zwischen GSK-3 und CDK2 ermittelt. Er liegt im Bereich der gleichen Größenordnung (ca. 60 bis 120). **21a** stellt folglich einen GSK-3/CDK9-Inhibitor mit Selektivität gegenüber anderen CDKs und verwandten Kinasen dar.

### 5.3.2 Potentieller Bindungsmodus von **21a** in der GSK-3 $\beta$

Zur Untersuchung eines potentiellen Bindungsmodus' des 11-Methoxy-substituierten 1-Azapaulons **21a** in der Bindetasche der GSK-3 $\beta$  wurde ein Docking unter Einsatz einer Röntgenkristallstruktur der GSK-3 $\beta$  mit Alsterpaullon **13** als cokristallisiertem Inhibitor (PDB ID: 1q3w)<sup>15</sup> durchgeführt (Abb. 5-8). Es sollte gezeigt werden, dass die neuartige 11-Methoxysubstitution keine sterische Hinderung verursacht.

Die meisten GSK-3-Inhibitoren sind ATP-kompetitiv und stellen kleine, vorwiegend planare und hydrophobe Heterozyklen dar. Sie binden über hydrophobe Wechselwirkungen und zwei oder drei Wasserstoffbrücken in die katalytische Tasche, indem das Val135 als Wasserstoffbrücken-Donor sowie als Akzeptor agiert und das Asp133 als zusätzlicher Akzeptor wirken kann.<sup>155</sup>

Das Programm USCF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco)<sup>16</sup>, mit dem die Docking-Pose visualisiert wurde, verwendet unterschiedliche geometrische Kriterien für die Darstellung von Wasserstoffbrücken, abhängig vom Donor-Akzeptor-Paar. Diese basieren auf Untersuchungen von Mills et al.<sup>141</sup> und wurden durch eine gewählte Toleranz dieser Parameter von 0.4 Å und 23 ° (empfohlene Toleranzen: 0.4 Å und 20 °)<sup>141</sup> erzeugt.



**Abbildung 5-8:** Docking-Pose von **21a** in der Bindetasche der GSK-3 $\beta$  (1q3w)<sup>15</sup>; Darstellung von Wasserstoffbrücken in hellblauer Farbe, rote Kugeln beschreiben Wassermoleküle

Erkennbar sind insbesondere die zwei Wasserstoffbrücken der Lactamstruktur zum Val135 der Hinge-Region und die Wasserstoffbrücken von der NH-Gruppe der Indolstruktur über das Wassermolekül W2 zur Seitenkette des Gln185. Diese treten in Analogie zur Bindung des kokristallisierten Alsterpaullons in der Bindetasche der GSK-3 $\beta$  auf. Eine zusätzliche Wasserstoffbrücke vom Carbonylsauerstoffatom der Lactamstruktur über das Wassermolekül W1 zum Asp133 fehlt im Vergleich zur räumlichen Orientierung des Alsterpaullons.<sup>15</sup>

Dagegen lässt sich über das Wassermolekül W2 eine weitere Wasserstoffbrücke vom Pyridinstickstoffatom zum Gln185 darstellen. Das Pyridoazepin-Strukturelement orientiert sich parallel zur Hinge-Region und der Aromat kann in hydrophobe Wechselwirkung mit der Seitenkette des Thr138 treten. Der Indolrest ist in Richtung des



*gatekeepers* Leu132 ausgerichtet und liegt oberhalb der hydrophoben Seitenkette des Leu188. Außerdem verursacht die 11-Methoxygruppe keine sterische Hinderung in dieser ermittelten Ausrichtung, da sie in den Lösungsmittel-zugewandten Bereich ragt.

### 5.3.3 Spezifische Proteinkinasen – GSK-3 und CDKs

#### Glycogen Synthase Kinase-3

Die Ser/Thr-Kinase Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) tritt in allen humanen Zellen mit einer gewebespezifischen Verteilung der zwei Isoformen, GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ , auf. Diese Isoformen gleichen sich in ihrer Kinasedomäne zu 97%. Durch inhibierende oder aktivierende Phosphorylierung an spezifischen Serin- (GSK-3 $\alpha$ : Ser21; GSK-3 $\beta$ : Ser 9) bzw. Tyrosinresten (GSK-3 $\alpha$ : Tyr279; GSK-3 $\beta$ : Tyr216) der GSK-3 regulieren übergeordnete Proteinkinasen die Aktivität dieses Enzyms. Zusätzlich wird die Aktivität in einzelnen Signalkaskaden durch eine Einbettung der GSK-3 in Multiproteinkomplexe sowie die intrazelluläre Verteilung von GSK-3 und Substrat beeinflusst. Außerdem weist die GSK-3 eine Präferenz für präphosphorylierte Substrate auf, die an der Aminosäure vier Positionen vor der GSK-3-Phosphorylierungsstelle bereits einen Phosphatrest tragen (Ser/Thr-X-X-X-pSer/pThr).<sup>156</sup>

In zahlreichen Signaltransduktionswegen wirkt die GSK-3 als Schlüsselenzym. So wird über den Wnt-Signalweg die nucleäre Transkription spezifischer, in Wachstum und Differenzierung involvierter Gene durch  $\beta$ -Catenin beeinflusst. Die Konzentration des Letzteren wird durch Komplexbildung mit dem Gerüstprotein Axin, weiteren Proteinen und der GSK-3 sowie simultane Phosphorylierung durch die GSK-3 reguliert. Über die Kontrolle der GSK-3 ist somit Einfluss auf Stammzellerneuerung und -differenzierung bei einzelnen Tumorformen und in der regenerativen Medizin denkbar.<sup>133,155</sup> Ähnlich hierzu ist die GSK-3 in die Hedgehog-Kaskade eingebunden, die ebenfalls über komplexartige Proteininteraktionen und Phosphorylierungsschritte die Aktivität eines Transkriptionsfaktors (Ci, *cubitus interruptus*) reguliert.<sup>157</sup> Schließlich wird die Aktivität der GSK-3 durch die PI3-Kinase (*phosphatidylinositol 3-kinase*)-Kaskade beeinflusst, die durch Bindung des Insulins oder verschiedener Wachstumsfaktoren an die jeweiligen Zellrezeptoren ausgelöst wird.<sup>157</sup>

Zusätzlich weist die GSK-3 eine Vielzahl von Substraten auf, zu denen metabolische, Signal- und Strukturproteine sowie Transkriptionsfaktoren gehören. Eine von Insulin ausgelöste Aktivierung des PI3-Signalwegs hemmt die durch GSK-3 induzierte,

inhibitorische Phosphorylierung der Glycogen-Synthase, wodurch der Zuckerhaushalt reguliert wird und eine Interventionsmöglichkeit bei Insulinresistenz entsteht.

Außerdem weist die GSK-3 zahlreiche Substrate im Zusammenhang mit neuronalen Erkrankungen auf. Bezüglich der Alzheimer-Erkrankung stellen die extrazelluläre Akkumulation des Amyloid- $\beta$ -Peptids und die intrazelluläre Aggregation hyperphosphorylierten Tau-Proteins die Hauptmarker dar. Sowohl mit der verstärkten Amyloid- $\beta$ -Expression als auch mit der Tau-Hyperphosphorylierung wird die GSK-3 in Zusammenhang gebracht.<sup>155</sup> Des Weiteren wurde eine wichtige Rolle der GSK-3 in apoptotischen Abläufen durch Interaktion mit verschiedenen Substraten wie dem Transkriptionsfaktor p53 gefunden. Gleichzeitig ist die Kinase essentiell für Abläufe, die das Überleben von Zellen sichern wie beispielsweise die NF- $\kappa$ B Aktivierung, die der TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose entgegenwirkt.<sup>157</sup> Eine exakte, lokalisierte Regulation der GSK-3-Aktivität ist folglich unumgänglich.

Auch Tumorerkrankungen stellen ein denkbares Ziel für die Einflussnahme über die GSK-3 dar, da die Kinase eine wichtige Rolle in der Dynamik des mitotischen Spindelapparates spielt sowie die Stabilität Zellzyklus-regulierender Cycline wie Cyclin D1 und E beeinflusst. Eine Inhibition der GSK-3 kann daher die mitotische Zellteilung unterbinden. Obwohl eine GSK-3-Inhibition durch die Verstärkung des Wnt-Signalweges theoretisch die Krebsentstehung fördern könnte, sprechen Untersuchungen gegen eine gesteigerte Tumorgenese unter Einsatz von GSK-3-Inhibitoren.<sup>155</sup>

### **Cyclin-abhängige Kinasen**

Das menschliche Genom kodiert für elf Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs), die die katalytische Untereinheit heterodimerer Ser/Thr-Kinasen darstellen. Eine Regulation der CDKs geschieht einerseits durch Phosphorylierung mit Hilfe übergeordneter CDK-aktivierender Kinasen (CKAs). Zur Erzielung der vollständigen Kinaseaktivität ist jedoch die nicht-kovalente Assoziation der CDKs mit einer regulatorischen Untereinheit erforderlich. Diese Regulatoren werden auf Grund ihres meist parallel zum Zellzyklus verlaufenden, periodischen Auf- und Abbaus als Cycline bezeichnet. Andererseits hemmen niedrigmolekulare, CDK-inibitorische Proteine (CKIs) durch Interaktion mit den Cyclin-Untereinheiten die Aktivität der CDKs.<sup>4,158</sup>

Überwiegend sind die CDKs (CDK1-4, 6 und 11) für den kontinuierlichen Verlauf des Zellzyklus' und dessen Kontrolle verantwortlich, indem unterschiedliche CDK/Cyclin-Komplexe während spezifischer Phasen des Zellzyklus' aktiv sind. Dagegen besitzt die

CDK5, für deren Aktivierung die Assoziation mit den atypischen Untereinheiten p35 oder p39 erforderlich ist, Aufgaben während der neuronalen Differenzierung. Die Cyclin-abhängigen Kinasen 7-11 sind in die Regulation von Transkriptionsmechanismen involviert und werden durch Cycline aktiviert, deren Expression keinen Zellzyklus-abhängigen Schwankungen unterliegt.<sup>53,158</sup>

Eine Fehlregulation der CDK-Aktivität wird in verschiedenen menschlichen Tumoren und Tumorzelllinien beschrieben, so dass sie als Zielstrukturen für die Entwicklung potentieller Therapeutika von Tumorerkrankungen genutzt werden.<sup>54</sup>

Eine genauere Betrachtung soll der CDK9 gelten, deren Isoformen CDK9-42 und CDK9-55 in allen humanen Geweben, insbesondere in ausdifferenzierten Zellen exprimiert werden. Sie assoziiert mit Cyclin T oder K zu einem Heterodimer, das den Hauptteil des basalen Transkriptionsfaktors P-TEFb darstellt.<sup>159</sup> Dieser unterstützt nach bereits erfolgter Initiierung der Transkription die Elongation der mRNA durch Aktivierung der RNA-Polymerase II, die eine Vielzahl von Genen zu mRNA transkribiert.<sup>19</sup> Unter den Expressionsprodukten befinden sich Transkriptionsfaktoren, Zytokine, Protein-kinasen und antiapoptotische Proteine.<sup>2</sup> Durch die Interaktion mit zahlreichen zellulären und viralen Proteinen spielt die CDK9 eine wichtige Rolle u.a. in der Differenzierung von Muskelzellen, bei der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten sowie bei der Replikation verschiedener Viren. Außerdem ist sie in Mechanismen der Apoptosehemmung involviert.

Eine Fehlregulation des CDK9-Signalwegs kann bei der Entwicklung oder dem Überleben maligner Zellen von Bedeutung sein. Vor allem die Expression antiapoptotischer Proteine oder bestimmter tumorrelevanter Proteine wie Mcl-1 (*myeloid leukemia cell differentiation protein*) ist hier von Bedeutung. In einer Vielzahl von Tumoren wie beispielsweise in Lymphomen und Zellen des Prostatakarzinoms wurden bereits erhöhte CDK9-Konzentrationen beobachtet.<sup>53,159</sup>

#### 5.3.4 Antiproliferative Aktivität der Verbindungen 20a und 21a

Die verwandte Substanz Kenpaullon **11** war bereits zuvor im *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) des *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA) hinsichtlich seiner antiproliferativen Aktivität gegenüber ca. 60 Tumorzelllinien getestet worden und erzielte eine mittlere Wachstumshemmung aller Zelllinien (GI<sub>50</sub>) von 43 µM.<sup>54</sup>

Auf Grund der vorliegenden Proteinkinase-inhibitorischen Eigenschaften von **20a** und **21a** wurden diese Paullonderivate hinsichtlich ihrer antiproliferativen Aktivität gegenüber

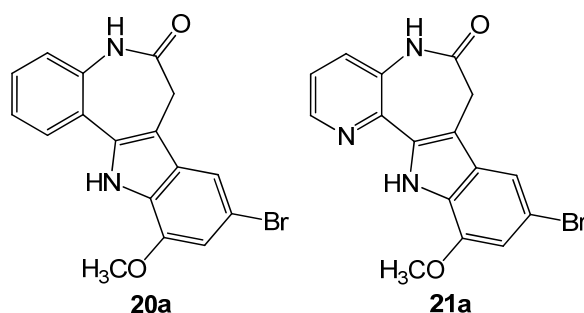
humanen Tumorzelllinien untersucht. Für den Assay wurden die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 und die humane Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 eingesetzt.

Die für die Paullonderivate interessanten Cyclin-abhängigen Kinasen werden in beiden Tumorzelllinien exprimiert. Als Regulatoren des Zellzyklus spielen sie eine wichtige Rolle in Tumorzellen, die eine erhöhte Proliferationsrate aufweisen.

Die GSK-3 tritt ebenfalls in beiden Zelllinien auf. Besonders in Brustkrebszellen wurde der Einfluss der GSK-3 untersucht, da diese den Estrogen-Rezeptor (ER) an Ser118 phosphorylieren kann und dadurch die Aktivität dieses zytoplasmatischen Rezeptors erhöht. Von Interesse ist diese Verknüpfung, da der Estrogen-Rezeptor (ER) einerseits in die Entwicklung der Brustdrüse und andererseits in die Entstehung von Mammakarzinomen involviert ist.<sup>42</sup>

Nach drei- (MCF-7) bzw. zweitägiger (HT-29) Inkubationszeit wurde die Proliferationshemmung durch **20a** und **21a** gegenüber der HT-29- bzw. der MCF-7-Zelllinie im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt und die IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt (Tab. 5-4).

**Tabelle 5-4:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM] von **20a** und **21a** gegenüber MCF-7- bzw. HT-29-Zellen



Zelllinien	<b>20a</b>	<b>21a</b>
<b>MCF-7</b>	n. b.	> 100 (46.1% <sup>a</sup> )
<b>HT-29</b>	25.7 ± 1.5	38.1 <sup>b</sup>

n. b.: nicht bestimmt

<sup>a</sup> Prozentuale Inhibition bei maximaler Konzentration (100 μM).

<sup>b</sup> Es konnte nur eine Messung ausgewertet werden.

Für die Verbindungen **20a** und **21a** wurde gegenüber der HT-29-Zelllinie antiproliferative Aktivität mit IC<sub>50</sub>-Werten im unteren mikromolaren Bereich bestimmt. Dabei weist **20a** entgegen dem Verhältnis der Kinase-inhibitorischen Aktivität einen niedrigeren IC<sub>50</sub>-Wert (25.7 μM) auf als das Azaanalogon **21a** (38.1 μM). Die MCF-7-Zellen konnten hinsichtlich ihrer Proliferation durch **21a** bei einer maximalen

Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  nur zu 46.1% inhibiert werden. Auf Grund nicht auswertbarer Ergebnisse wurde der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für **20a** nicht bestimmt.

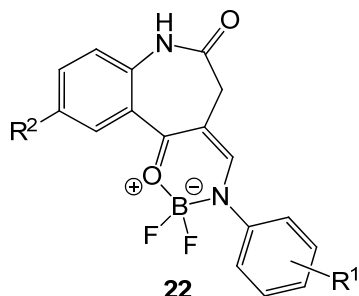
Eine Aussage zur Zellgängigkeit der Verbindungen und zum Einfluss von Kinase-inhibitorischen Effekten auf die Proliferationshemmung kann durch diesen Assay nicht getroffen werden. Die stärkere Kinaseinhibition von **21a** verglichen mit **20a** resultiert nicht in einer ebenfalls höheren Proliferationshemmung der Tumorzellen. Im Vergleich zu einem vom NCI (vgl. Kapitel 5.2.3) bestimmten  $\text{GI}_{50}$ -Wert des Kenpaullons **11** von 43  $\mu\text{M}$  zeigen die zwei Verbindungen gegenüber den HT-29-Zellen eine vergleichbare Inhibition des Zellwachstums.

## 5.4 Biologische Aktivität der Difluoroborkomplexe **22**

### 5.4.1 Proteinkinase-inhibitorische Eigenschaften der Verbindungen **22**

Ebenso wie die Strukturen der Paullone stellen die Borkomplexe **22**  $\alpha$ -anellierte 1-Benzazepinone dar und wurden auf Grund dieser Analogie als potentielle Proteinkinase-Inhibitoren untersucht. Von der Firma ProQinase GmbH, Freiburg, wurde in einem *in vitro*-Assay die prozentuale Restaktivität von 16 tumorrelevanten Proteinkinasen unter Zusatz der Verbindungen **22a-d**, **f-n**, **r**, **s** und **u-y** bestimmt. Tabelle 5-5 fasst die Restaktivitäten einzelner Kinasen durch ausgewählte Verbindungen **22** zusammen. Die aufgeführten Proteinkinasen stellen die durch die Borkomplexe **22** am stärksten inhibierten Enzyme des untersuchten Kinasepools dar.

**Tabelle 5-5:** Prozentuale Restaktivitäten [%] der Kinasen unter Zusatz ausgewählter Verbindungen **22** [jeweils 10 µM]



**22a** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H  
**22c** R<sup>1</sup> = 4-NO<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> = H  
**22g** R<sup>1</sup> = 4-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sup>2</sup> = H  
**22m** R<sup>1</sup> = 3,5-di-Cl, R<sup>2</sup> = H  
**22r** R<sup>1</sup> = 2-CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H

**22u** R<sup>1</sup> = 2-OCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = I  
**22v** R<sup>1</sup> = 2-Cl, R<sup>2</sup> = I  
**22x** R<sup>1</sup> = 2-Cl, R<sup>2</sup> = Phenylethynyl  
**22y** R<sup>1</sup> = 4-CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = Phenylethynyl

Verbindung	ALK	Aurora B	FAK	IGF1-R	SRC	VEGF-R2
<b>22a</b>	93	104	73	88	74	88
<b>22c</b>	38	56	67	33	13	17
<b>22g</b>	84	85	78	73	70	74
<b>22m</b>	26	65	57	56	49	51
<b>22r</b>	96	83	79	75	71	75
<b>22u</b>	89	71	83	87	83	65
<b>22v</b>	15	58	50	46	28	34
<b>22x</b>	12	72	55	49	33	32
<b>22y</b>	22	60	67	83	68	53

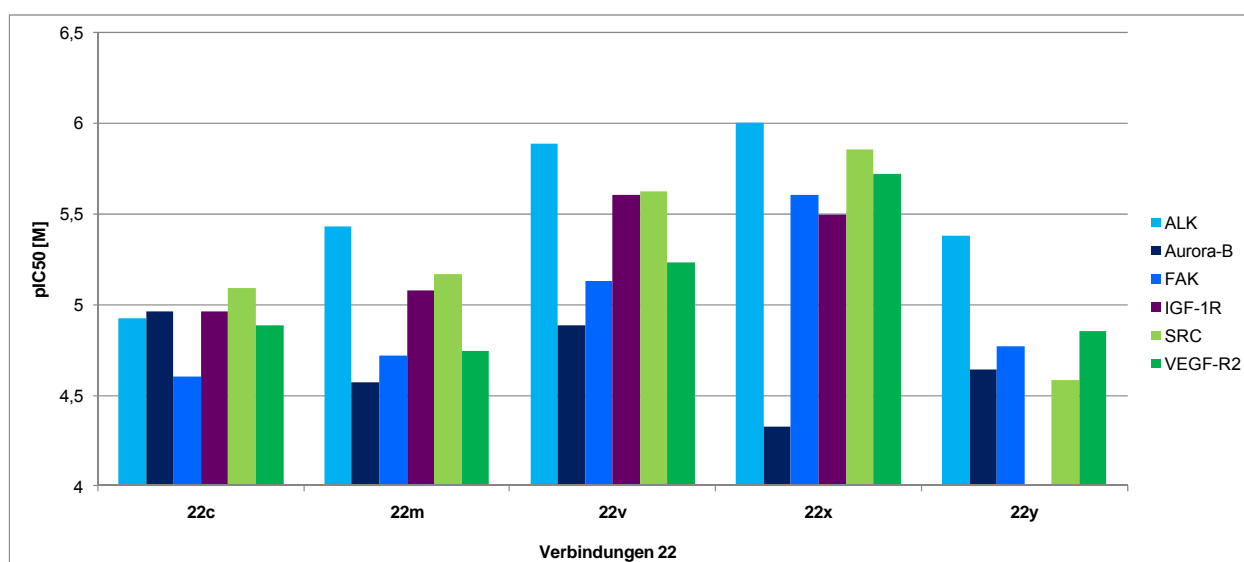
Im Vergleich der hier aufgeführten Verbindungen lassen **22a** (R<sup>1</sup> = H), **22g** (R<sup>1</sup> = 4-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), **22r** (R<sup>1</sup> = 2-CH<sub>3</sub>) und **22u** (R<sup>1</sup> = 2-OCH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup> = I) die höchste Restaktivität der Kinasen zu, die mit einer Ausnahme oberhalb von 70% liegt. Zu diesen vier Derivaten gehört der am *N*-Phenylrest unsubstituierte Borkomplex **22a** sowie drei Verbindungen mit elektronenschiebenden Resten an diesem Strukturelement.

Dagegen ergeben die Verbindungen **22c** (R<sup>1</sup> = 4-NO<sub>2</sub>), **22m** (R<sup>1</sup> = 3,5-di-Cl), **22v** (R<sup>1</sup> = 2-Cl; R<sup>2</sup> = I), **22x** (R<sup>1</sup> = 2-Cl; R<sup>2</sup> = Phenylethynyl) und **22y** (R<sup>1</sup> = 4-CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup> = Phenylethynyl) überwiegend Restaktivitäten von < 70%, besonders **22c** zeigt eine ausgeprägte Hemmwirkung. Von den fünf letztgenannten Verbindungen wurden die IC<sub>50</sub>-Werte an den 16 Kinasen bestimmt. Die oben aufgeführten Enzyme mit Ausnahme der Aurora B wiesen hier die niedrigsten Werte auf (Tab. 5-6 und Abb. 5-9).

**Tabelle 5-6:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM] durch Lösungen der Verbindungen **22c**, **m**, **v**, **x** und **y** an ausgewählten Kinasen<sup>a</sup>

Verbindung	ALK	Aurora B	FAK	IGF-1R	SRC	VEGF-R2
<b>22c</b>	12	11	25	11	8.1	13
<b>22m</b>	3.7	27	19	8.4	6.8	18
<b>22v</b>	1.3	13	7.4	2.5	2.4	5.9
<b>22x</b>	1.0	47	2.5	3.2	1.4	1.9
<b>22y</b>	4.2	23	17		26	14

<sup>a</sup> Fehlende Werte sind mit IC<sub>50</sub>-Werten > 100 μM gleichzusetzen.



**Abbildung 5-9:** pIC<sub>50</sub>-Werte [M] (-log<sub>10</sub>IC<sub>50</sub>) durch Lösungen der Verbindungen **22c**, **m**, **v**, **x** und **y** an ausgewählten Kinasen<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Fehlende Balken sind mit pIC<sub>50</sub>-Werten ≤ 4 (IC<sub>50</sub>-Werten ≥ 100 μM) gleichzusetzen.

Eine strukturelle Gemeinsamkeit der fünf hier untersuchten Verbindungen **22** findet sich in der Substitution mit einem elektronenziehenden Rest. Die Substanzen tragen einen solchen Substituenten am *N*-Phenylrest (R<sup>1</sup>), mit Ausnahme der *para*-methylierten Verbindung **22y**, die einen Phenylethynylrest am Benzazepinon-Grundkörper (R<sup>2</sup>) besitzt. Insgesamt liegen die IC<sub>50</sub>-Werte dieser Verbindungen im niedrig-mikromolaren Bereich, zum Teil bei einstelligen Werten. Die niedrigsten IC<sub>50</sub>-Werte finden sich bei der ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) sowie der SRC-Kinase, dagegen wird die Aurora B am geringsten inhibiert.

Für die Verbindungen **22v** und **22x** wurden Konzentrationen im einstelligen mikromolaren Bereich zur 50%igen Hemmung der aufgeführten Kinasen mit Ausnahme der Aurora B ermittelt. Beide Derivate sind am *N*-Phenylrest in *ortho*-Position mit einem Chloratom substituiert und tragen einen Rest am Benzazepin-Grundkörper. Geringste inhibitorische Aktivität zeigt dagegen die Lösung der oben beschriebenen Verbindung **22y** mit elektronenschiebender *para*-Methylsubstitution am *N*-Phenylrest, deren IC<sub>50</sub>-Wert an IGF-1R sogar oberhalb von 100 µM liegt.

Bereits bei der analytischen Charakterisierung der Borkomplexe **22** war das Auftreten von Instabilität einiger Derivate in Lösung aufgefallen. Diese Zersetzungseigenschaften konnten wie in Kapitel 3.4.4.4 dargestellt vor allem bei den Borverbindungen **22** mit elektronenziehenden Substituenten am *N*-Phenylrest festgestellt werden. Ein Iodsubstituent am Benzazepinon-Ringsystem erzeugte eine geringe Instabilität, wohingegen zur Phenylethynylsubstitution an dieser Position keine Untersuchungen durchgeführt wurden. Für den *in vitro*-Assay wurden die Verbindungen **22** in DMSO gelöst, sofort tiefgefroren und nur für die Testung aufgetaut und zur benötigten Konzentration verdünnt. Ein Aliquot wurde für die Untersuchung entnommen und der Rest der Lösungen wiederum tiefgefroren. Anschließend wurde in diesen Lösungen die Reinheit der jeweiligen Substanz durch HPLC (AUC 100%-Methode) bestimmt.

Bei **22c** mit *para*-Nitrosubstituent lagen zu diesem Zeitpunkt nur noch 20% der intakten Verbindung vor, **22m**, **v** und **x** wurden mit 40 – 50% detektiert und nur **22y** zeigte in der verwendeten Lösung eine Reinheit von 99%. Auf Grund dieser teilweise starken Instabilität kann keine Aussage dazu getroffen werden, in wieweit die intakten Substanzen **22c**, **m**, **v** und **x** während der Testungen in ausreichender Reinheit vorlagen. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte können daher nicht eindeutig auf die Aktivität der unzersetzten Borkomplexe zurückgeführt werden, insbesondere da keine weitergehenden Untersuchungen zur Art und inhibitorischen Aktivität der Zersetzungsprodukte durchgeführt wurden.

Es ist einerseits möglich, dass elektronenziehende Substituenten am *N*-Phenylrest vorteilhaft für die Bindung in der katalytischen Tasche der jeweiligen Kinase sind und dadurch die inhibitorische Aktivität erhöhen. Andererseits ist die Entstehung stärker kinaseinhibitorisch aktiver Substanzen durch Zersetzung möglich. Eine Ausnahme bildet Verbindung **22y**, deren Lösung nach der Testung keine Instabilität aufwies. Allerdings konnte für diese Verbindung keine Stabilitätsuntersuchung durchgeführt werden, so dass die generellen Zersetzungseigenschaften unbekannt sind. Das



Verhalten von **22y** in dem für den Assay eingesetzten Aliquot der Lösung unter den Testbedingungen kann daher nicht eingeschätzt werden.

Dagegen zeigten **22a**, **g**, **r** und **u** nach den Kinase-Testungen jeweils eine ausreichende Reinheit von > 96%. Bei **22a** und **g** wurde in Stabilitätsuntersuchungen keine Zersetzung festgestellt, so dass die prozentuale Inhibition der Proteinkinasen in diesem Fall mit großer Wahrscheinlichkeit auf die intakten Verbindungen zurückzuführen ist. Bei **22r** und **u** kann eine derartige Aussage nicht mit Sicherheit getroffen werden, da in Stabilitätstests nach vier Wochen nur eine Reinheit von ca. 80% detektiert werden konnte.

Die Edukte **54** der Borkomplexe **22** wurden von Dunkel<sup>94</sup> hinsichtlich ihrer Kinase-inhibitorischen Aktivität beschrieben. Da die Kinase-Panels der Assays für die Verbindungen **22** und **54** neun gleiche Proteinkinasen (AKT1, ARK5, Aurora B, FAK, IGF-1R, MET, PLK1, SRC, VEGF-R2) aufwiesen, kann bezüglich dieser Enzyme ein Vergleich der Strukturen durchgeführt werden. Sämtliche stabilen Borkomplexe **22** erzeugen wie die jeweiligen Edukte **54** an den genannten Kinasen in Konzentrationen bis maximal 10 µM eine prozentuale Inhibition von höchstens 30%. Während von **22c**, **m**, **v**, **x** und **y** IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt wurden, wurden diese nur für die Edukte **54x** und **y** ermittelt. Dabei weist **22x** an allen übereinstimmenden Kinasen zum Teil deutlich geringere IC<sub>50</sub>-Werte auf als **54x**, während dies analog für **22y** im Vergleich zu **54y** mit Ausnahme von SRC und VEGF-R2 gilt. Die prozentuale Kinaseinhibition von **22c**, **m** und **v** ist verglichen mit den entsprechenden Edukten **54** signifikant stärker. Mit einer Ausnahme hemmen die Edukte in Konzentrationen bis maximal 10 µM die Kinasen zu < 30%, wohingegen **22c**, **m** und **v** besonders an IGF-1R, MET, SRC und VEGF-R2 deutlich stärkere inhibitorische Aktivität zeigen.

#### 5.4.2 Spezifische Proteinkinasen – ALK und VEGF-R

Die von den Borkomplexen **22** besonders stark inhibierten Kinasen IGF-1R, SRC und FAK sowie die Aurora-Kinasen wurden bereits beschrieben (vgl. Kapitel 5.2.3).

##### ALK

Die ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) wird als RTK vorrangig in Zellen des ZNS, des Darms sowie der Prostata und der Testes exprimiert. Die genauen physiologischen Eigenschaften der ALK im Menschen konnten bislang nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Es wird ein Einfluss auf die neuronale Entwicklung und die Funktion des ZNS

postuliert, wobei die ALK vermutlich während der Embryogenese am stärksten exprimiert und im Erwachsenenalter auf einem geringen Level gehalten wird.

Als mögliche aktivierende Liganden der ALK werden die Wachstumsfaktoren PTN (Pleiotrophin) und MK (Midkine) beschrieben, die in zahlreiche Prozesse wie neuronale Entwicklung, Zellmigration und Angiogenese involviert sind. Bei der durch ALK-Aktivierung verstärkten Zellproliferation wird der PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*)-Weg als nachfolgender Signalweg vermutet. Gleichzeitig kann die ALK-abhängige Apoptosehemmung durch die Aktivierung des MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Wegs ausgelöst werden.

Zahlreiche unterschiedliche Chromosomentranslokationen sind bekannt, die die verstärkte Expression von ALK-Fusionsproteinen auslösen. Das jeweils fusionierte Partnerprotein bestimmt dabei die zelluläre Lokalisation des Fusionsproteins und verursacht eine dauerhafte Autophosphorylierung der ALK-Kinasedomäne, woraus eine übermäßige Kinaseaktivität resultiert. Vor allem in Lymphomen wie dem ALCL (*anaplastic large cell lymphoma*), aber auch in soliden Tumoren wie dem NSCLC (*non-small cell lung cancer*) und den IMTs (*inflammatory myofibroblastic tumors*) treten solche onkogen veränderten ALK-Fusionsproteine auf.<sup>160-161</sup>

### VEGF-R

Die Familie der VEGF (*vascular endothelial growth factor*)-Rezeptoren umfasst die strukturell verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGF-R1 (FLT1), VEGF-R2 (KDR) und VEGF-R3 (FLT4). Durch die Bindung der dimeren Liganden VEGF-A bis D und PlGF (*placenta growth factor*), die unterschiedliche Bindungsspezifitäten für die extrazellulären Rezeptordomänen der Rezeptorsubtypen aufweisen, wird die jeweilige zytoplasmatische Kinasedomäne aktiviert.<sup>162</sup>

Das VEGF-Signalsystem ist vorrangig für die Angiogenese, die Lymphangiogenese sowie die Vaskulogenese verantwortlich. Die Angiogenese beschreibt die Sprossung und das Wachstum neuer Blutgefäße aus vorhandenen Gefäßen, während bei der Lymphangiogenese neue Lymphgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen geschaffen werden. Dagegen wird die Bildung neuer Blutgefäße aus endothelialen Vorläuferzellen als Vaskulogenese bezeichnet.

VEGF-R1 und VEGF-R2 sind vorwiegend auf vaskulären Endothelzellen exprimiert, während VEGF-R3 auf lymphatischen Endothelzellen zu finden ist. Der VEGF-R2 wird als hauptsächlicher Angiogenese-auslösender Rezeptor angesehen, da er Proliferation,

Differenzierung und Überleben der Endothelzellen sowie die Migration endothelialer Vorläuferzellen unterstützt und die endotheliale Permeabilität verstärkt. Der VEGF-R1 rekrutiert hämatopoetische Vorläuferzellen, reguliert Monozyten- und Makrophagenmigration und funktioniert als negativer Regulator des VEGF-R2, indem er die VEGF-Liganden mit einer höheren Affinität bindet, jedoch die nachfolgenden Signalwege in geringerem Umfang aktiviert. Dagegen ist der VEGF-R3 hauptsächlich auf den lymphatischen Endothelzellen zu finden und vermittelt Signale, die zur Ausbildung von Lymphgefäßen führen.<sup>162-165</sup>

Die normale, humane Angiogenese tritt u.a. bei der Ovulation, der Reproduktion und in der Wundheilung auf, indem die VEGF-Expression durch zahlreiche Zytokine, Wachstumsfaktoren und Gonadotropine moduliert wird. Die übermäßige VEGF-Ausschüttung ist in zahlreiche pathophysiologische Vorgänge involviert, die wie z.B. Entzündungen, kardiovaskuläre Erkrankungen und Retinopathien mit anormaler Angiogenese assoziiert sind.<sup>163</sup>

Einen besonderen Stellenwert besitzt die Neovaskularisierung in der Tumorgenese. Verursacht durch Hypoxie setzen Tumorzellen im Zentrum solider Tumore verstärkt VEGF frei, um mit Hilfe der Ausbildung neuer Blutgefäße die Nährstoffversorgung des wachsenden Tumors zu gewährleisten. Zusätzlich kann durch die Unterdrückung von Tumorsuppressorgenen, durch verschiedene Onkogene wie die SRC-Kinase oder exogene Faktoren wie Hormone eine übermäßige VEGF-Expression in Tumorzellen ausgelöst werden. Angiogenetische Vorgänge sind essentiell für das Tumorwachstum oberhalb einer Tumorgroße von 1-2 mm<sup>3</sup> und die Überexpression von VEGF konnte in zahlreichen Tumorformen registriert werden.<sup>164</sup>

Zusätzlich werden VEGF-Rezeptoren auf Tumorzellen exprimiert, so dass die Liganden autokrin auf die Tumorzellen wirken und deren Migration, Invasion und das Zellüberleben unterstützen.<sup>162,166</sup> Die Hemmung des VEGF-Rezeptors beeinflusst sowohl die für das Tumorwachstum erforderliche Angiogenese als auch die Tumorzellen selber und stellt damit eine vielversprechende antineoplastische Therapieoption dar.

#### 5.4.3 Antiproliferative Aktivität der Verbindungen **22g** und **22r**

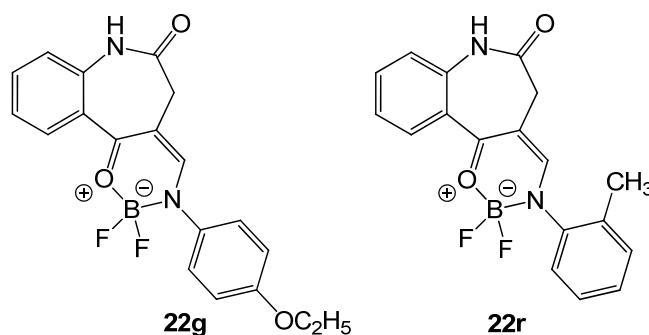
Zur Untersuchung der antiproliferativen Aktivität der Borkomplexe **22** sollten zwei Derivate ausgewählt werden, die einerseits eine möglichst hohe kinaseinhibitorische Aktivität und andererseits Stabilität in Lösung aufweisen. Die Verbindungen **22g** und **22r** wurden auf Grund ihrer vergleichsweise starken Kinasehemmung und erwiesener

Stabilität mit einer Reinheit von mehr als 90% nach einer Woche in DMSO-Lösung eingesetzt. Die prozentuale Restaktivität der Kinasen FAK, IGF-1R, SRC und VEGF-R2 lag unter Zusatz von **22g** bzw. **22r** unter 80%.

Für den Assay zur Proliferationshemmung wurden die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 und die humane Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 eingesetzt. In zahlreichen Darmkrebszelllinien, so auch in HT-29-Zellen, und Brustkrebszelllinien tritt eine Überexpression von FAK und SRC auf. Dadurch kommt es zu verringerter Zelladhäsion, die Migration und Metastasierung unterstützt und zu verstärktem Zellüberleben der Tumorzellen.<sup>167-169</sup> Eine übermäßige SRC-Aktivität führt zur Expression proangiogenetischer Faktoren wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), der die Tumorangiogenese unterstützt.<sup>170</sup> Gleichzeitig wurde in Darmkrebszelllinien wie HT-29 die Expression des VEGF-R2 festgestellt, die eine autokrine Proliferationsverstärkung verursacht.<sup>166</sup> Diese autokrine Wachstumsstimulation tritt auch bei der Brustkrebszelllinie MCF-7 auf.<sup>171</sup> Der Wachstumsfaktorrezeptor IGF-1R verstärkt ebenfalls das übermäßige Wachstum von Tumorzellen.

Eine Inhibition der beschriebenen Kinasen hat daher Einfluss auf Tumorwachstum und -überleben der MCF-7- und HT-29-Zellen. Die in Tabelle 5-7 dargestellten IC<sub>50</sub>-Werte gegenüber diesen zwei Zelllinien wurden für **22g** und **22r** ermittelt.

**Tabelle 5-7:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **22g** und **22r** gegenüber MCF-7- und HT-29-Zellen



Zelllinien	<b>22g</b>	<b>22r</b>
<b>MCF-7</b>	25.5 ± 0.1	60.6 ± 2.3
<b>HT-29</b>	46.4 ± 7.6	> 100 (49.2% <sup>a</sup> )

<sup>a</sup> Prozentuale Inhibition bei maximaler Konzentration (100 μM).

Die Borkomplexe **22g** und **22r** zeigen Proliferationshemmung gegenüber der MCF-7- und der HT-29-Zelllinie im mikromolaren Bereich. Dabei werden die MCF-7-Zellen jeweils stärker in ihrem Wachstum inhibiert als die HT-29-Zellen. Im Vergleich beider Verbindungen weist das 2-Methylderivat **22g** zweifach so hohe  $IC_{50}$ -Werte wie die 4-Ethoxyverbindung **22r** auf. Da sich die Kinase-inhibitorische Aktivität beider Verbindungen annähernd gleicht (vgl. Tab. 5-5), kann der Unterschied der antiproliferativen Aktivität nicht über die Hemmung der untersuchten Proteinkinasen erklärt werden.

#### 5.4.4 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung

Proteinkinasen stellen, auch im Fall von Rezeptor-Tyrosinkinasen, intrazelluläre Zielstrukturen für niedrig-molekulare Inhibitoren dar, die die Kinase über eine Bindung an die ATP-Bindetasche hemmen. Daher ist in der Entwicklung potentieller ATP-kompetitiver Kinaseinhibitoren die Zellgängigkeit eine essentielle Eigenschaft. Wie bereits beschrieben weisen die dargestellten Borkomplexe **22** einerseits Kinase-inhibitorische Aktivität auf und wirken andererseits antiproliferativ gegenüber Tumorzellen. Die Eigenschaft der Zellgängigkeit der Verbindungen **22** sollte daher untersucht und zusätzlich eine mögliche intrazelluläre Verteilung analysiert werden.

Auf Grund der spektroskopischen Eigenschaften der Borkomplexe **22** konnte die Methode der Fluoreszenzmikroskopie angewandt werden, ohne dass die Notwendigkeit einer Fluoreszenzmarkierung der zu untersuchenden Moleküle bestand. Für die Untersuchung wurden die bereits im Proliferationsassay eingesetzten Verbindungen **22g** und **22r** sowie zusätzlich **22u** verwendet. Mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes wurden von zuvor mit der jeweiligen Substanz inkubierten HT-29-Zellen Fluoreszenzabbildungen angefertigt. Gleichzeitig wurde von demselben Ausschnitt des Zellrasens eine DIC (*Differential Interference Contrast*)-Aufnahme zur Darstellung der Zellen angefertigt (Abb. 5-10, 5-11, 5-12).

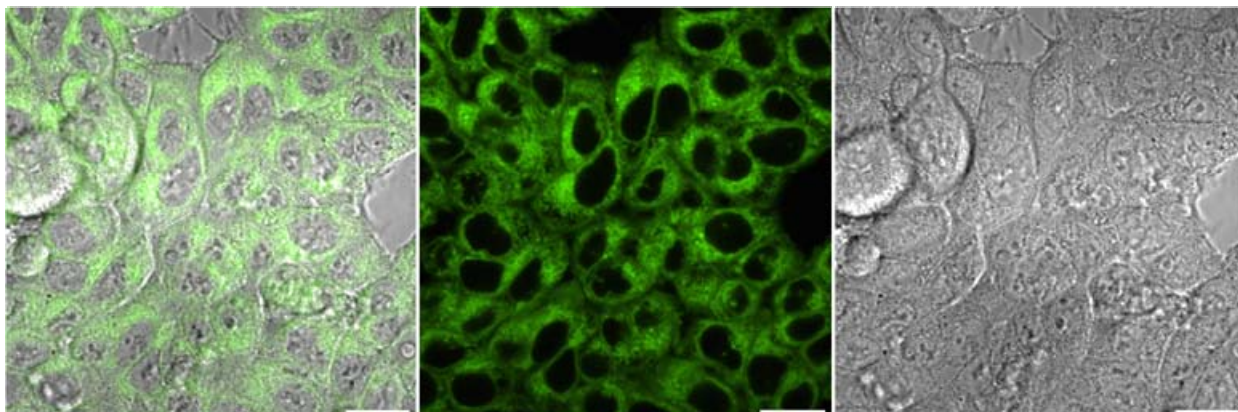


Abbildung 5-10: HT-29-Zellen inkubiert mit Verbindung **22g**; DIC-Abbildung (rechts), Fluoreszenzabbildung (Mitte), Überlagerung (links); Balken: 20  $\mu\text{m}$

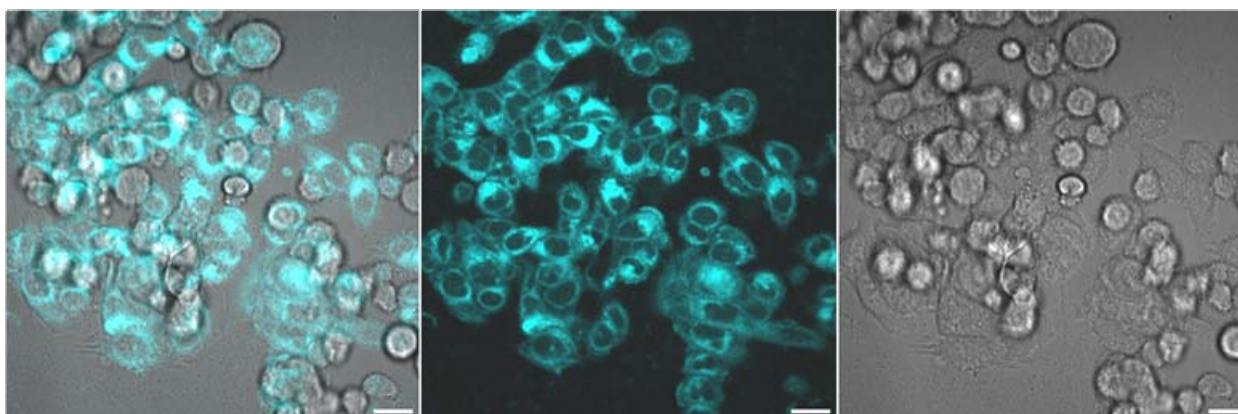


Abbildung 5-11: HT-29-Zellen inkubiert mit Verbindung **22r**; DIC-Abbildung (rechts), Fluoreszenzabbildung (Mitte), Überlagerung (links); Balken: 20  $\mu\text{m}$

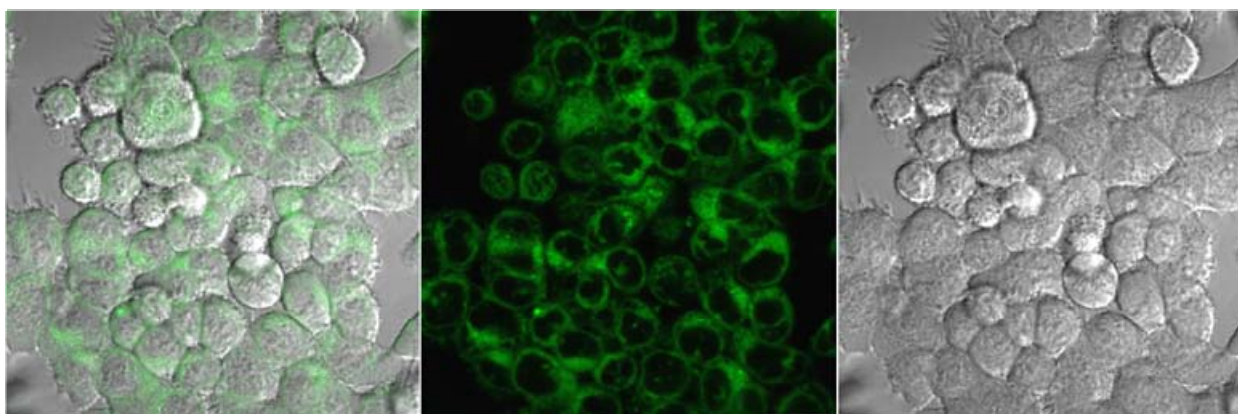


Abbildung 5-12: HT-29-Zellen inkubiert mit Verbindung **22u**; DIC-Abbildung (rechts), Fluoreszenzabbildung (Mitte), Überlagerung (links); Balken: 20  $\mu\text{m}$

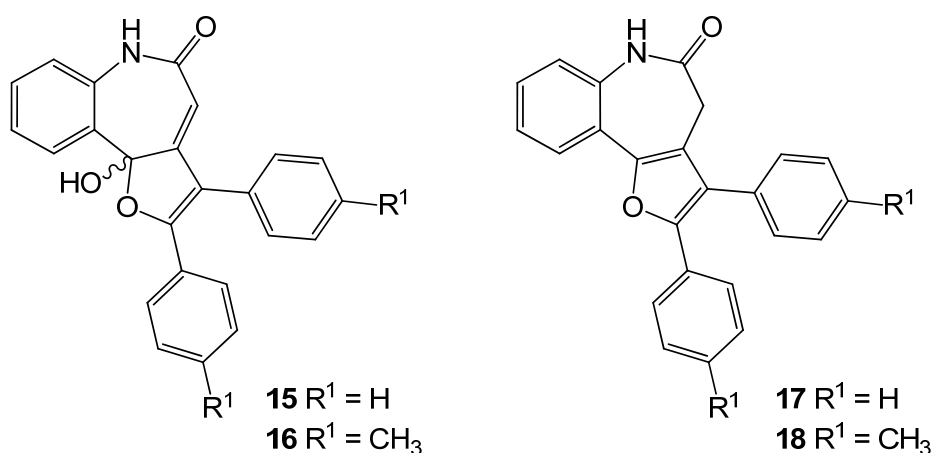
Die jeweils mittleren Abbildungen zeigen eine starke Fluoreszenzemission im Bereich der HT-29-Zellen. Eine Vergleichsuntersuchung mit unbehandelten Zellen ergab nur eine minimale Hintergrundfluoreszenz und bestätigt die Abhängigkeit der Emissionsstrahlung vom Vorliegen der Borkomplexe. Zusätzlich wurde die Fokusebene des konfokalen Lasermikroskops verändert, um zu gewährleisten, dass die fluoreszierenden Borkomplexe nicht auf der Zellmembran lokalisiert sind.

Die Abbildungen dokumentieren die Zellgängigkeit der Borkomplexe **22g**, **r** und **u**. Durch die links dargestellte Überlagerung der Fluoreszenzabbildung mit der DIC-Aufnahme kann eine intrazelluläre Lokalisation erkannt werden, die den Zellkern ausnimmt. Eine Zuordnung zu spezifischen Zellkompartimenten kann nicht getroffen werden.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Synthese und in einer ersten biologischen Charakterisierung *d*-anellierter 1-Benzazepin-2,5-dione als Analoga zu Paullonen.

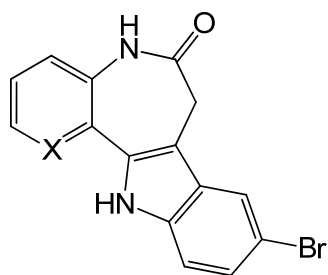
Hinsichtlich des von Stukenbrock<sup>77</sup> entwickelten (*RS*)-10b-Hydroxy-2,3-diphenyl-6,10b-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-ons (**15**) gelang durch strukturierte Syntheseoptimierung eine Verdopplung der literaturbeschriebenen Ausbeute. Eine Struktur-erweiterung konnte in Form der *para*-methylysubstituierten Verbindung **16** erzielt werden und unter reduktiven Bedingungen wurde die Darstellung der analogen Furanderivate **17** und **18** ermöglicht.



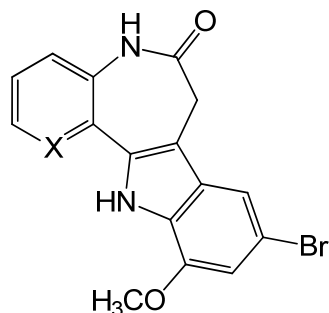
Die Furanderivate **17** und **18** inhibierten insbesondere ALK, IGF-1R und SRC mit  $IC_{50}$ -Werten  $< 4 \mu M$ . Docking-Studien von **17** in ATP-Bindetaschen verschiedener Kinasen ergaben Hinweise auf unterschiedliche Bindungsmodi und lieferten dadurch mögliche Erklärungen für kinasespezifische Aktivitätsunterschiede. Für das Halbketal **15** wurde eine deutliche Proliferationshemmung im Tumorzelllinien-Panel des NCI mit  $GI_{50}$ -Werten im mikromolaren Bereich ermittelt.

Die Inhibitoren der GSK-3 und Cyclin-abhängiger Kinasen Kenpaullon **11**<sup>54</sup> und 1-Aza-kenpaullon **12**<sup>55</sup> wurden durch 11-Methoxysubstitution zu **20a** und **21a** strukturell erweitert.





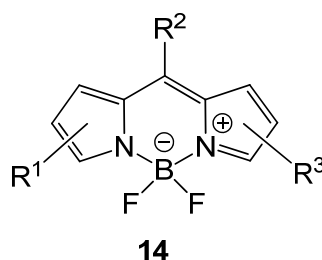
**11** X = CH (Kenpauillon)  
**12** X = N (1-Azakenpauillon)



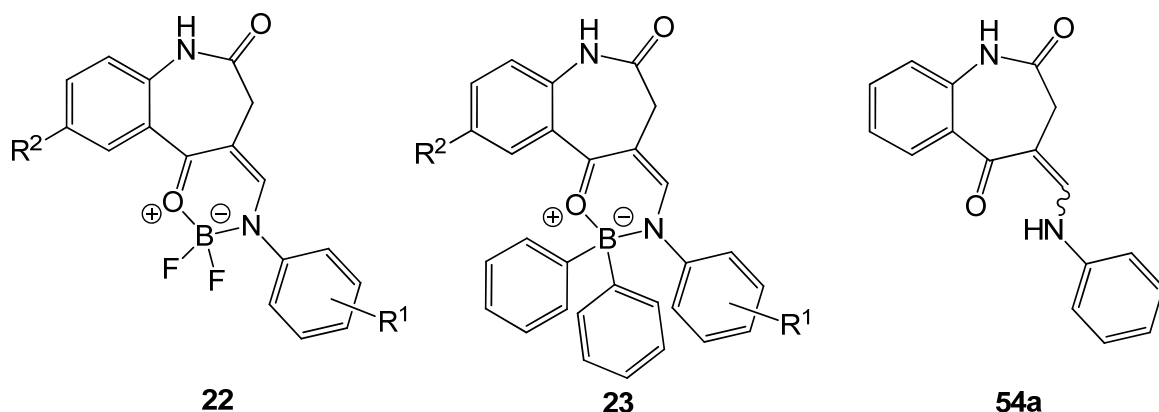
**20a** X = CH  
**21a** X = N

Durch diese Substitution weisen die Verbindungen ein neuartiges inhibitorisches Profil mit CDK9/GSK-3-Selektivität auf, wobei das 1-Azaanalogon **21a** verglichen mit **20a** niedrigere IC<sub>50</sub>-Werte im nanomolaren Bereich aufweist. Eine Docking-Pose von **21a** in der GSK-3 $\beta$  zeigt die Umgehung einer sterischen Hinderung durch Orientierung der Methoxygruppe in den Lösungsmittel-zugewandten Bereich. Gegenüber der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 konnte für **20a** und **21a** eine Proliferationshemmung mit IC<sub>50</sub>-Werten im unteren mikromolaren Bereich festgestellt werden.

In Anlehnung an die Struktur der BODIPYs **14**<sup>72</sup> gelang die Darstellung einer Bibliothek unterschiedlich substituierter Difluoroborkomplexe **22** mit 1-Benzazepinon-Grundkörper, deren Struktur durch die Darstellung der Diphenylborverbindungen **23** zusätzlich variiert wurde.



Die neuen Borverbindungen wurden hinsichtlich ihrer spektroskopischen Eigenschaften untersucht. Durch vergrößerte Stokes-Verschiebungen im Vergleich mit der unsubstituierten Ausgangssubstanz **54a** stellen **22** und **23** eine für zelluläre Fluoreszenzassays geeignete Weiterentwicklung dar.

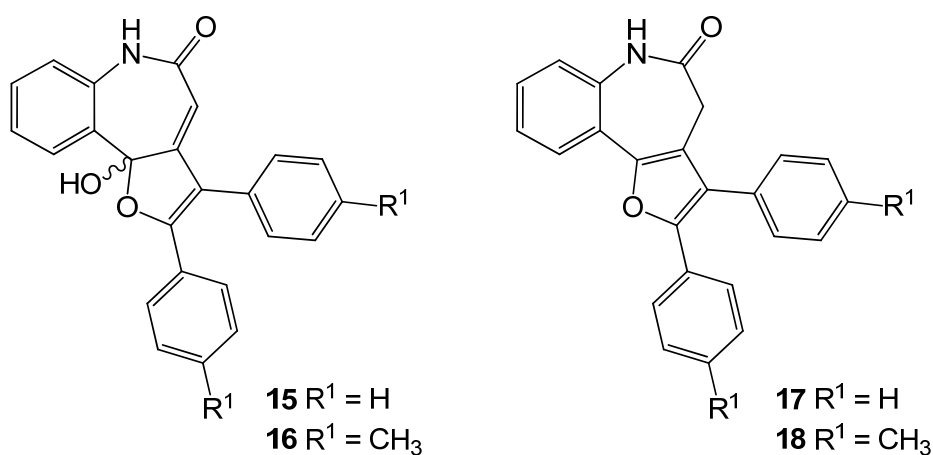


In einem Assay zur Kinaseinhibition wurden einzelne Borkomplexe **22** als niedrig-mikromolare Hemmstoffe der Kinasen ALK, FAK, IGF-1R, SRC und VEGF-R2 identifiziert. In Stabilitätsuntersuchungen wurde bei gelösten Borkomplexen **22** mit elektronenziehender Substitution am *N*-Phenylrest Instabilität nachgewiesen. Bei diesen Verbindungen ist daher keine Zuordnung der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte zu den intakten Borkomplexen **22** möglich. Die zur Bestimmung der antiproliferativen Aktivität exemplarisch ausgewählten, stabilen Borverbindungen zeigen Proliferationshemmung gegenüber der MCF-7- und der HT-29-Zelllinie im mikromolaren Bereich. Nach Inkubation von HT-29-Zellen mit stabilen Borverbindungen **22** gelang die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der intrazellulären Lokalisation und damit gleichzeitig der Nachweis der Zellgängigkeit der neuen Borverbindungen.

## 7 Summary

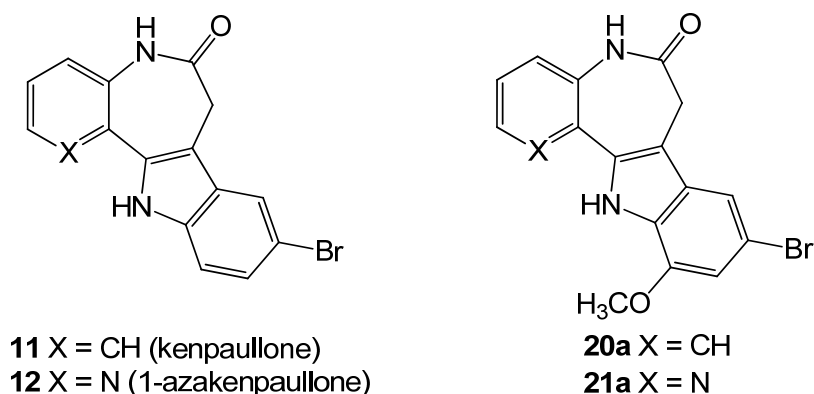
The aim of the study reported here was the synthesis and initial biological characterization of novel *d*-annulated 1-benzazepine-2,5-diones as analogues of paullones.

The synthesis of (*RS*)-10b-hydroxy-2,3-diphenyl-6,10b-dihydro-5*H*-benzo[*b*]furo[2,3-*d*]-azepin-5-one (**15**), which was initially developed by Stukenbrock<sup>77</sup>, was optimized by modification of reaction conditions and induced an enhanced 23% yield. The 4-methyl substituted analogue **16** was obtained under the same conditions. A reductive conversion of both compounds resulted in the corresponding furo derivatives **17** and **18**.



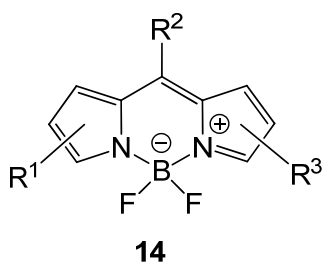
In a screening against protein kinases with relevance to tumorigenesis **17** and **18** inhibited ALK, IGF-1R, and SRC with low micromolar  $IC_{50}$  values. The binding modes of **17** in the ATP-binding sites of certain kinases were studied by molecular docking to provide a description of the distinct biological activity. In the IVCLSP of the NCI compound **15** showed antiproliferative activity against a panel of 60 tumor cell lines with low micromolar  $GI_{50}$  values.

Kenpaullone **11** and 1-azakenpaullone **12** have been previously identified as potent and selective inhibitors of GSK-3 and cyclin-dependent kinases.<sup>54-55</sup> Introduction of a methoxy-group into 11-position generated the modified paullone structures **20a** and **21a**.

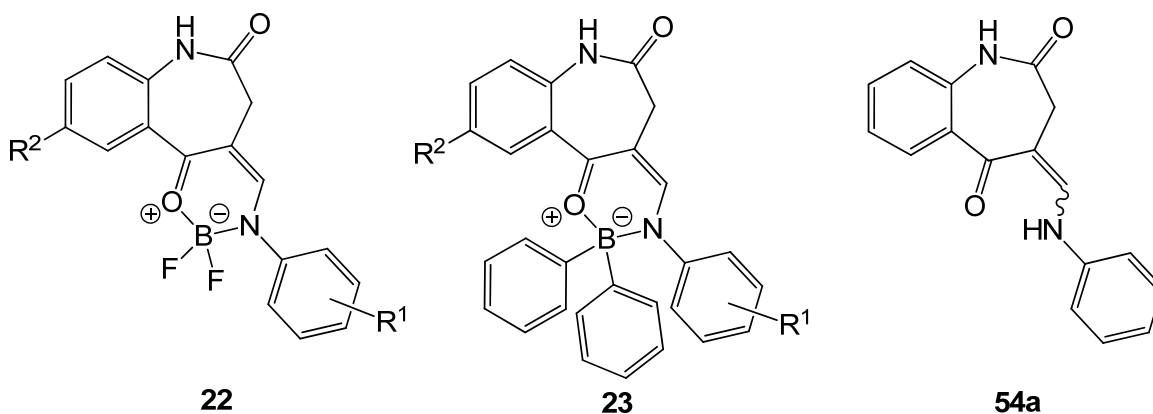


Caused by this substitution pattern, the compounds exhibit modified kinase inhibition profiles displaying selectivity against GSK-3 and CDK9 with **21a** showing lower IC<sub>50</sub> values in the nanomolar range. A docking pose of **21a** in GSK-3 $\beta$  showed no steric hindrance of the newly inserted methoxy-group but an extension into the solvent exposed area. **20a** and **21a** induced growth inhibition of HT-29 cells with micromolar IC<sub>50</sub> values.

Based on the core structure of BODIPY derivatives **14**<sup>72</sup>, differently substituted difluoroboryl compounds **22** of a benzo[*b*]azepine-2,5-dione parent structure were synthesized. A structural variation was achieved by analogues **23** bearing phenyl groups rather than fluorine atoms on the boron center.



Compounds **22** and **23** were analyzed with regard to their spectroscopic properties. The fluorescent derivatives revealed a broader Stokes' shift than the unsubstituted synthetic precursor **54a**. Consequently, **22** and **23** may be considered as structurally improved derivatives of **54a** in terms of their feasibility in cellular fluorescence assays.



Kinase inhibition assays identified distinct boron complexes **22** as low micromolar inhibitors, namely of ALK, FAK, IGF-1R, SRC, and VEGF-R2. Stability testing revealed the degradation of dissolved boron complexes **22** with electron withdrawing groups R<sup>1</sup>. For these compounds, the IC<sub>50</sub> values determined in the kinase inhibition assays could not be allocated unambiguously to the intact molecules **22**. For the determination of the antiproliferative activity, stable compounds **22** were chosen, which revealed micromolar IC<sub>50</sub> values against MCF-7 and HT-29 cells. After incubation of HT-29 cells with stable complexes **22** the intracellular distribution of the compounds was visualized by fluorescence microscopy, concomitantly submitting evidence of cell permeability.

## 8 Experimenteller Teil

### 8.1 Allgemeines

#### 8.1.1 Geräte und Methoden

##### Absorptionsspektroskopie

UV/VIS Spektralphotometer Specord® 40, Spektralanalyse-Software WinASPEKT®, Analytik Jena AG, Jena; Makro-Küvetten für Absorptionsmessungen 100 QS, Quarzglas, Schichtdicke 10 mm (Fa. Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim);

Einstellungen: Schrittweite 1 nm, Geschwindigkeit 5-10 nm/sec, Messbereich 200-550 nm (Bestimmung der Quantenausbeute 250-450 nm), Korrektur mit Lösungsmittel als Referenz.

##### Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigfolien Polygram® Sil G/UV<sub>254</sub>, 40 x 80 mm, 0.2 mm Kieselgelschicht mit Fluoreszenzindikator, Fa. Macherey-Nagel, Düren; Detektion bei 254 und 366 nm; als Fließmittel werden vorwiegend Gemische aus Toluol und Ethylacetat oder Ethylacetat/Ethanol/Ameisensäure (8:8:3) eingesetzt.

##### Elementaranalytik

CE Instruments Flash EA® 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest, San Jose, CA, USA; Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

##### Fluoreszenzspektroskopie

Fluorescence Spectrophotometer Cary Eclipse®, Software Cary Eclipse Scan Application, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt; Makro-Küvetten für Fluoreszenzmessungen 101 QS, Quarzglas, Schichtdicke 10 mm (Fa. Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim);

Einstellungen bei 22 und 23: Einsatz der Wellenlänge des Absorptionsmaximums zur Exzitation, Messbereich 400-800 nm, Spaltbreiten Exzitations- und Emissionsstrahlung 5-10 nm, medium/high detector voltage, slow scan control, Korrektur mit Lösungsmittel als Referenz.

Einstellungen zur Bestimmung der Quantenausbeute: Zur Exzitation Wellenlänge im Schnittpunkt zweier Absorptionsspektren genutzt, Messbereich 350-650 nm, Spaltbreite Exzitationsstrahlung 2.5 nm, Spaltbreite Emissionsstrahlung 5 nm, medium detector voltage, slow scan control, Korrektur mit Lösungsmittel als Referenz.

### **Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), analytisch**

LaChrom Elite®: Pump L-2130, Autosampler L-2200, Column Oven L-2300, Diode Array Detector L-2450, OrganizerBox L-2000, Trennsäule Merck LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt.

Probenvorbereitung: 1 mg Probe wird in 1000 µl DMSO gelöst. 400 µl dieser Lösung werden mit DMSO zu 1000 µl verdünnt und durch einen Acrodisc® MHP 13 µm Filter filtriert. Das Absorptionsmaximum des Hauptpeaks sollte im Bereich von 300-800 mAU liegen. Gegebenenfalls wird eine Anpassung der Probenkonzentration vorgenommen.

Elution: Injektionsvolumen 10 µl; Flussrate 1.000 ml/min; Maximaltemperatur 50-70 °C; Gesamtlaufzeit 15 min (Verbindungen **15**: 20 min) ; angestrebte Gesamtretentionszeit ( $t_{M+N}$ ) 5-8 min.

Elutionsmittel: Gemische aus ACN und H<sub>2</sub>O (bidest.) bzw. (Et<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Puffer (pH 2-3) im angegebenen Verhältnis; Pufferherstellung: Lösung von 20 ml Triethylamin und 242 mg Natriumhydroxid in bidestilliertem Wasser zu 1 l und Einstellung mit konz. Schwefelsäure auf pH 2.7; isokratische Elution [Verbindungen **15**: 0-4 min (ACN/H<sub>2</sub>O; 20:80), 4-6 min (Gradient), 6-20 min (ACN/H<sub>2</sub>O; 60:40)].

Detektion: DAD bei 254 und 280 nm, bei **22** und **23** zusätzlich 380 nm.

Auswertung: Integration der Peakflächen und Auswertung mittels 100%-Methode, Integrationsausschluss 1.55 min, Threshold 500, Bestimmung der Nettoretentionszeit ( $t_N$ ) und der Totzeit ( $t_M$ ) bezogen auf DMSO, Absorptionsmaxima ( $\lambda_{max}$ ) entnommen aus den UV-Spektren des DAD, verwendete Software: EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3.

### **Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), präparativ**

LaPrep P110 Preparative HPLC Pump, LaPrep P311 Spectralphotometer, LaPrep P216 Fraction Collector, Säulenrohr Merck: Länge 125 mm, Innendurchmesser 25 mm, verbunden mit einem Merck Selbstfüllstand NW25, Säulenmaterial Merck: LiChrospher® 100 RP-18, 12 µm, Fa. Merck, Darmstadt; Probenschleife (max. Injektionsvolumen 5 ml), Fa. Knauer, Berlin.

Elution: Flussrate 40 ml/min, isokratisch.

Elutionsmittel: Gemische aus Acetonitril und bidestilliertem Wasser.

Detektion: 254 nm.

### **Infrarotspektroskopie**

Thermo Nicolet FT-IR 200, Fa. Thermo Nicolet, Madison, WI, USA; Vermessung der Substanzen als KBr-Presslinge.

### **Kernresonanzspektroskopie**

Bruker Avance II-300 ( $^{11}\text{B}$ -NMR-Messung: 96.3 MHz), Bruker Avance DRX-400 ( $^1\text{H}$ -NMR-Messung: 400.1 MHz,  $^{19}\text{F}$ -NMR-Messung: 376.4 MHz), Bruker Avance II-600 ( $^1\text{H}$ -NMR-Messung: 600.1 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messung: 150.9 MHz), Fa. Bruker, Billerica, MA, USA; NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig; Lösungsmittel: DMSO- $d_6$ .

$^1\text{H}$ -NMR: Interner Standard Tetramethylsilan, Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der  $\delta_{\text{TMS}}$ -Skala; Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration.

$^{13}\text{C}$ -NMR: Interner Standard analog zu  $^1\text{H}$ -NMR; Aufnahme der Spektren mit  $^1\text{H}$ -Breitbandentkopplung; der Zusatz (2C) verweist auf ein überlagertes Signal zweier magnetisch äquivalenter Kohlenstoffatome; zusätzliche Durchführung einer  $^{13}\text{C}$ -DEPT135-Messung.

$^{11}\text{B}$ -NMR: Externe Referenz Bortrifluorid-Etherat.

$^{19}\text{F}$ -NMR: Externe Referenz Trichlorfluormethan.

Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett.

### **Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie**

Inverses Mikroskop (Nikon Ti) an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop-System (Nikon A1), mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv (Nikon, Plan Apo VC, NA 1.4), Fa. Nikon GmbH, Düsseldorf; Fluoreszenzexcitation mit einem 405 nm-Diodenlaser, Fa. CVI Melles Griot, Albuquerque, NM, USA; Aufnahme der Fluoreszenzemission mit einem Bandpass Filter 482/35 bzw. 525/50.



## Lösungsmittel

Sofern nicht anders angegeben, wurden ungetrocknete Lösungsmittel eingesetzt. Eine Trocknung erfolgte in Anlehnung an publizierte Methoden.<sup>172</sup>

Diethylether: Zur Vortrocknung wird der Ether zunächst mehrere Tage über Kaliumhydroxid gelagert. Anschließend wird er destilliert und über Natriumdraht aufbewahrt.

Ethanol: In einer Apparatur mit Dreihalskolben und Rückflusskühler mit Metallwendel wird Ethanol (mindestens 99%) vorgelegt. Unter Stickstoffatmosphäre werden portionsweise ca. 7-10 g/l Natriumschnitzel hinzugefügt und anschließend solange erhitzt, bis sich das Natrium vollständig gelöst hat. Es werden ca. 30 g/l Phthalsäurediethylester hinzugegeben und die Mischung für 3 h zum Rückfluss erhitzt. Nach abschließender Destillation wird der getrocknete Ethanol über Molekularsieb (3 Å) gelagert.

Toluol: In einem Rundkolben mit Wasserabscheider, Kühler und Trockenrohr wird Toluol zum Rückfluss erhitzt und das Kondensat im Wasserabscheider solange abgelassen, bis es nicht mehr getrübt ist. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden ca. 15 g/l Calciumchlorid hinzugefügt. Ein Tropftrichter mit Druckausgleich wird zwischen Rundkolben und Kühler integriert und bei geöffnetem Hahn 2-3 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird bei geschlossenem Hahn das getrocknete Toluol auffangen und über Molekularsieb (4 Å) gelagert.

## Massenspektroskopie

Finnigan-MAT 95, Fa. Thermo Finnigan MAT, Bremen; Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig; Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV;

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS): Interner Massenstandard Perfluorkerosin, Hochauflösung des Signals des Molekülradikalkations  $[M]^{+\bullet}$  oder des Signals  $[M-H]^+$ , Angabe der exakten Masse des ungeladenen Moleküls als theoretischer Wert des  $[M]^{+\bullet}$ .

## Mikrowellen-Synthese

CEM Fokussiertes Mikrowellen<sup>TM</sup> Synthese System, Typ Discover; Chem Driver<sup>TM</sup> Application Software Program; Reaktionsgefäße: 10 ml mit Teflonseptum (geschlossenes System), Fa. CEM GmbH, Kamp-Lintfort; Jun-Air Kompressor, Blue Line Model 4, Fa. Jun-Air International, Nørresundby, Dänemark.

## Röntgenkristallstruktur-Analyse

Datensammlung: Die Kristalle wurden in Inertöl auf Glasfäden montiert, in den Kaltgasstrom des Diffraktometers (Bruker SMART 1000 CCD) gebracht und mit monochromatisierter Mo-K $\alpha$ -Strahlung vermessen; Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig.

Strukturauflösung: Direkte Methoden.

Strukturverfeinerung und weitere numerische Einzelheiten: Kapitel 8.2 (Synthesen und analytische Daten, röntgenographische Daten).

## Schmelzpunktbestimmung

Electrothermal IA 9100, Fa. Barnstedt International, Southend-on-Sea, Essex, Großbritannien.

### 8.1.2 Bezug der Ausgangsmaterialien

Ausgangsstoffe und Reagenzien wurden über Acros Organics (Geel, Belgien) oder Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. 3-Aminopyridin-2-carbonsäure (**29**) wurde von der Firma Matrix Scientific (Columbia, SC, USA) und Triphenylboran (**63**) von der Firma Alfa Aesar GmbH & Co KG (Ward Hill, MA, USA) erworben.

## 8.2 Synthesen und analytische Daten

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Synthese der Difluoro- $\{(4Z)-4-[(\text{phenylamino-}\kappa N)\text{methyliden}]-3,4\text{-dihydro-}1H\text{-}1\text{-benzazepin-}2,5\text{-dionato-}\kappa O^5\}$ -bor-Komplexe **22a-d**, **22f-n**, **22r** und **s** sowie **22u-y**

Das entsprechende 4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54**; 0.5 mmol) wird unter Stickstoffatmosphäre in trockenem Toluol (10 ml) unter Erhitzen zum Reflux gelöst bzw. suspendiert. Nach Zugabe von Ethyldiisopropylamin (85  $\mu$ l, 0.50 mmol) wird langsam eine Lösung aus Bortrifluorid-Etherat (0.137 ml, 2.50 mmol) in trockenem Toluol (1 ml) zugetropft. Es wird unter Stickstoffatmosphäre zum Reflux erhitzt, bis laut dünnschichtchromatographischer oder HPLC-Analyse kein Edukt mehr im Reaktionsansatz vorhanden ist. Tritt nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur ein Niederschlag auf, wird dieser abgesaugt, mit 10%iger Salzsäure (3 x 10 ml) und anschließend mit Wasser (3 x 10 ml) gewaschen. Das Filtrat bzw. der Reaktionsansatz

ohne entstandenen Niederschlag wird ebenfalls mit 10%iger Salzsäure (3 x 10 ml) und anschließend mit Wasser (3 x 10 ml) extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird mit dem eventuell anfangs isolierten Niederschlag vereinigt und aus Toluol umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV 2): Synthese der {(4*Z*)-4-[(Phenylamino- $\kappa$ N)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-diphenylbor-Verbindungen (**23a-c**)

Das entsprechende 4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54**; 0.5 mmol) wird unter Stickstoffatmosphäre in trockenem Toluol (20 ml) unter Erhitzen zum Reflux gelöst bzw. suspendiert. Eine Lösung von Triphenylboran (**63**; 182 mg, 0.750 mmol) in trockenem Toluol (2 ml) wird langsam zugetropft. Es wird unter Stickstoffatmosphäre zum Reflux erhitzt, bis laut dünnschichtchromatographischer Analyse kein Edukt mehr im Reaktionsansatz vorhanden ist. Tritt nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur ein Niederschlag auf, wird dieser abgesaugt. Das Filtrat bzw. der Reaktionsansatz ohne entstandenen Niederschlag wird im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird mit dem eventuell anfangs isolierten Niederschlag vereinigt und aus Aceton umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV 3): Synthese des 5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylesters (**28**) und des 1-Azaanalogons **32**

Methode A

Alle Arbeitsschritte werden unter Stickstoffbegasung mit zuvor getrockneten Geräten und einem Rückflusskühler mit Metallwendel sowie mit getrockneten Lösungsmitteln durchgeführt!

Kaliumhydrid (2.0 g, 50 mmol) (Vorsicht! Kaliumhydrid entzündet sich sofort beim Kontakt mit Wasser oder Feuchtigkeit!) wird dreimal mit Toluol (7 ml) gewaschen und anschließend in Toluol (8 ml) suspendiert. 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]benzoesäureethylester (**27**; 2.93 g, 10.0 mmol) bzw. dessen Azaanalogon **31** (2.94 g, 10.0 mmol) werden in *N,N*-Dimethylformamid (5 ml) und Toluol (30 ml) gelöst und über einen Tropftrichter in die im vorgekühlten Silikonbad gerührte Suspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird bis zur vollständigen Umsetzung bei 70-75 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit Eisessig (1.5 ml) vorsichtig neutralisiert und anschließend Wasser (30 ml) zugetropft. Die Suspension

wird im Eisbad gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol 96% umkristallisiert.

### Methode B

Kalium-*tert*-butylat (2.2 g, 20 mmol) wird in getrocknetem Toluol (6 ml) suspendiert. 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]benzoesäureethylester (**27**; 1.17 g, 4.00 mmol) bzw. dessen Azaanalogon (**31**; 1.18 g, 4.00 mmol) werden in *N,N*-Dimethylformamid (2 ml) und getrocknetem Toluol (12 ml) gelöst und über einen Tropftrichter in die unter Stickstoffbegasung im vorgekühlten Silikonbad gerührte Suspension getropft. Nach Beendigung des Zutropfens wird bis zur vollständigen Umsetzung bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit Eisessig (1 ml) vorsichtig neutralisiert und anschließend Wasser (12 ml) zugetropft. Die Suspension wird im Eisbad gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol 96% umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV 4): Synthese der 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-5-phenylhydrazone **47a** und **47b**, der 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-phenylhydrazone **48a** und **48b** und des 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-phenylhydrazons (**67**)

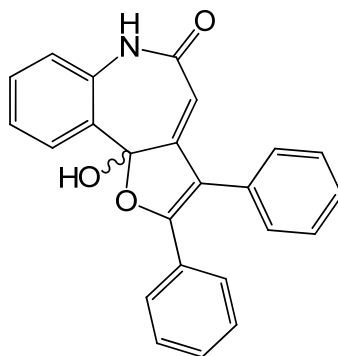
Das 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**; 247 g, 1.00 mmol) bzw. das 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**24b**; 248 mg, 1.00 mmol) wird mit Phenylhydrazin (**66**; 0.15 ml, 1.5 mmol) [bzw. einem entsprechend substituierten Phenylhydrazin-Hydrochlorid (**44** bzw. **46**; 1.1 oder 1.5 mmol) und Natriumacetat (1.1 oder 1.5 mmol)] in Eisessig (10 ml) für 30-60 min bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird in 5%ige Natriumacetat-Lösung (20 ml) gegossen. Ein entstandener Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol 96% umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV 5): Synthese der 4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dione **54a-e**

Zu einer Lösung aus 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**52**; 230 mg, 1.00 mmol) in Eisessig (4 ml) wird das entsprechende Anilinderivat **53a-e** (1.0 mmol) hinzugefügt. Es wird bei Raumtemperatur gerührt, bis laut dünn-

schichtchromatographischer Reaktionskontrolle kein Edukt mehr zu detektieren ist. Der Reaktionsansatz wird auf eiskaltes Wasser (30 ml) gegossen und der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol 96% umkristallisiert.

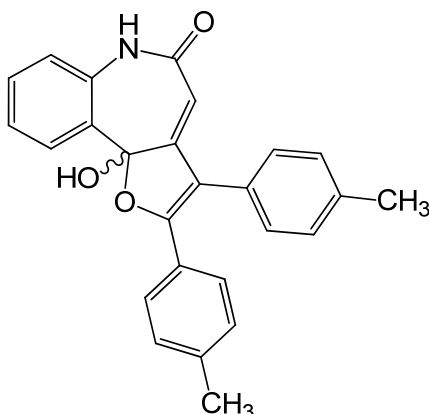
(*RS*)-10b-Hydroxy-2,3-diphenyl-6,10b-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**15**)



3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**; 350 mg, 2.00 mmol) wird mit Benzil (**33**; 420 mg, 2.00 mmol) und Kalium-*tert*-butylat (224 mg, 2.00 mmol) in trockenem Tetrahydrofuran (5.0 ml) für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch anschließendes Eingießen in *n*-Hexan (20.0 ml) bildet sich ein Niederschlag, der abgesaugt und mit Petrolether gewaschen wird. Nach der Trocknung wird der Niederschlag in Wasser (20.0 ml) gelöst bzw. suspendiert und mit 50%iger Essigsäure neutralisiert. Ein durch die Neutralisation entstandener Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Aceton umkristallisiert. Es werden 170 mg (23%) eines hellgelben Pulvers erhalten.

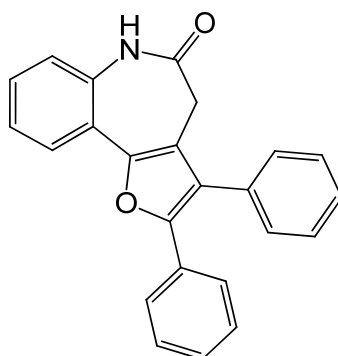
Schmp.: 201-202 °C (Lit.<sup>77</sup>: 201–203 °C).

10b-Hydroxy-2,3-bis(4-methylphenyl)-6,10b-dihydro-5H-furo[3,2-d][1]benzazepin-5-on  
**(16)**



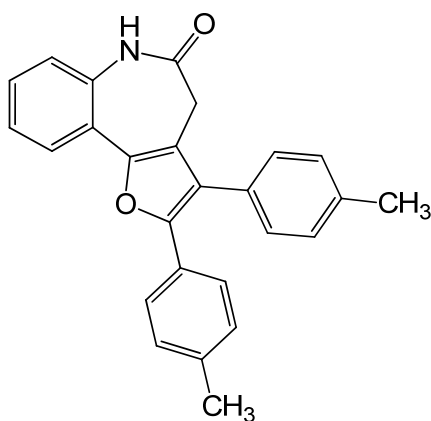
3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**; 350 mg, 2.00 mmol) wird mit 4,4'-Dimethylbenzil (**34**; 476 mg, 2.00 mmol) und Kalium-*tert*-butylat (224 mg, 2.00 mmol) in trockenem Tetrahydrofuran (30.0 ml) für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Ansatz in Wasser (90.0 ml) gegossen, mit 50%iger Essigsäure neutralisiert und für 12 h im Kühlschrank aufbewahrt. Ein entstandener Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Ethylacetat umkristallisiert. Es werden 18 mg (2.3%) eines hellgelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 232-233 °C; IR (KBr): 3513 cm<sup>-1</sup> (OH), 3036 cm<sup>-1</sup> (CH aromatisch), 2976 cm<sup>-1</sup> (CH aliphatisch), 1660 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.29 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, Azepin-CH, Kopplung verschwindet bei D<sub>2</sub>O-Zugabe), 7.11–7.12 (m, 2H, ArH), 7.16 (ddd, 1H, *J* = 7.6/7.6/1.0 Hz, ArH), 7.19-7.21 (m, 2H, ArH), 7.24 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.0 Hz, ArH), 7.27-7.28 (m, 2H, ArH), 7.36 (ddd, 1H, *J* = 7.6/7.6/1.5 Hz, ArH), 7.43-7.45 (m, 2H, ArH), 7.78 (dd, 1H, *J* = 7.8/1.5 Hz, ArH), 7.94 (s, 1H, OH, Signal verschwindet bei D<sub>2</sub>O-Zugabe), 10.26 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, NH, Signal verschwindet bei D<sub>2</sub>O-Zugabe); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.8, 20.9 (prim. C); 108.3, 120.8, 123.1, 124.7, 127.4 (2C), 129.1 (2C), 129.3, 129.5 (2C), 129.8 (2C) (tert. C); 102.9, 111.7, 126.4, 128.1, 128.7, 135.7, 137.2, 140.4, 158.0, 158.8, 165.4 (quart. C); C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub> (395.46); ber. C 78.97, H 5.35, N 3.54; gef. C 68.94, H 4.81, N 2.89; MS (EI): *m/z* (%) = 395 [M]<sup>+</sup> (34); HRMS (EI): *m/z* [M]<sup>+</sup> ber. 395.15216; gef. 395.15259; HPLC: 99.1% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm, *t*<sub>N</sub> = 4.73 min, *t*<sub>M</sub> = 1.02 min (ACN/H<sub>2</sub>O; 60:40), λ<sub>max</sub>: 237 nm und 361 nm.

2,3-Diphenyl-4,6-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**17**)

(*RS*)-10*b*-Hydroxy-2,3-diphenyl-6,10*b*-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**15**; 55 mg, 0.15 mmol) und Zinn(II)chlorid-Dihydrat (169 mg, 0.750 mmol) werden in einer Mischung aus Eisessig (3 ml) und konzentrierter Salzsäure (0.1 ml) für 10 min bei 80 °C gerührt. Ein farbloser Niederschlag wird nach Abkühlung auf Raumtemperatur isoliert und anschließend mit Wasser und Petrolether gewaschen. Es werden 40 mg (71%) eines weißen Pulvers erhalten.

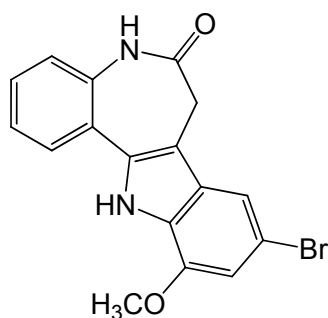
Schmp.: 278-279 °C (Lit.<sup>77</sup>: 277–279 °C).

2,3-Bis(4-methylphenyl)-4,6-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**18**)

10*b*-Hydroxy-2,3-bis(4-methylphenyl)-6,10*b*-dihydro-5*H*-furo[3,2-*d*][1]benzazepin-5-on (**16**; 79 mg, 0.20 mmol) und Zinn(II)chlorid-Dihydrat (226 mg, 1.00 mmol) werden in einer Mischung aus Eisessig (4 ml) und konzentrierter Salzsäure (0.13 ml) für 10 min bei 80 °C gerührt. Ein gelblicher Niederschlag wird nach der Abkühlung auf Raumtemperatur isoliert und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Es werden 55 mg (73%) eines hellgelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 299-300 °C; IR (KBr): 3194 cm<sup>-1</sup> (NH), 3055 cm<sup>-1</sup> (CH aromatisch), 2974 cm<sup>-1</sup> und 2920 cm<sup>-1</sup> (CH aliphatisch), 1660 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.15-7.17 (m, 2H, ArH), 7.20-7.24 (m, 3H, ArH), 7.28 (ddd, 1H, *J* = 7.6/7.5/1.2 Hz, ArH), 7.32-7.34 (m, 2H, ArH), 7.37-7.40 (m, 3H, ArH), 7.84 (dd, 1H, *J* = 7.7/1.6 Hz, ArH), 10.32 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 20.7, 20.8 (prim. C); 30.8 (sek. C); 121.7, 123.7, 125.0, 125.2 (2C), 128.4, 129.2 (2C), 129.4 (2C), 129.6 (2C) (tert. C); 117.8, 120.1, 122.2, 127.3, 134.3, 137.2, 137.3, 145.8, 149.1, 170.2 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 512 Scans); C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub> (379.46); ber. C 82.30, H 5.58, N 3.69; gef. C 76.27, H 5.19, N 3.31; MS (EI): *m/z* (%) = 379 [M]<sup>+</sup> (100), HRMS (EI): *m/z* [M]<sup>+</sup> ber. 379.15723; gef. 379.15648; HPLC: 98.4% bei 254 nm und 98.4% bei 280 nm, *t*<sub>N</sub> = 2.76 min, *t*<sub>M</sub> = 1.10 min (ACN/H<sub>2</sub>O; 80:20),  $\lambda_{\text{max}}$ : 228 nm und 329 nm.

#### 9-Brom-11-methoxy-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)on (20a)



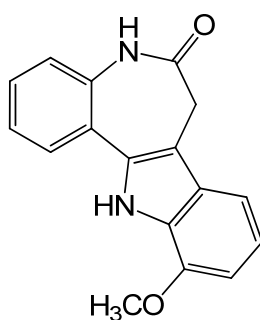
3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**; 175 mg, 1.00 mmol) wird mit 4-Brom-2-methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid (**44**; 380 mg, 1.50 mmol) und Natriumacetat (123 mg, 1.50 mmol) in Eisessig (10 ml) für 60 min bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden wenige Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugegeben und für 4 h auf 90 °C erhitzt. Nach dem erneuten Abkühlen auf Raumtemperatur wird in 5%ige Natriumacetat-Lösung (40 ml) gegossen. Ein entstandener Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser und Petrolether gewaschen und aus Ethanol 96%/Toluol (1:1) umkristallisiert. Anschließend wird das Produkt mittels der präparativen HPLC (ACN/H<sub>2</sub>O, 50:50) isoliert und es werden 113 mg (32%) eines weißlichen Pulvers erhalten.

Schmp.: ab 180 °C Zersetzung; IR (KBr): 3442 cm<sup>-1</sup> und 3194 cm<sup>-1</sup> (NH), 3099 cm<sup>-1</sup> und 3065 cm<sup>-1</sup> (CH aromatisch), 2961 cm<sup>-1</sup> und 2929 cm<sup>-1</sup> (CH aliphatisch), 1673 cm<sup>-1</sup>



(C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.98 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.87 (d, 1H,  $J$  = 1.5 Hz, ArH), 7.22-7.25 (m, 2H, ArH), 7.35-7.38 (m, 1H, ArH), 7.51 (d, 1H,  $J$  = 1.5 Hz, ArH), 7.84 (dd, 1H,  $J$  = 7.8/1.3 Hz, ArH), 10.08 (s, 1H, NH), 11.85 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.6 (OCH<sub>3</sub>); 31.4 (sek. C); 105.8, 113.1, 122.1, 123.4, 127.7, 128.1 (tert. C); 107.9, 111.6, 122.4, 126.2, 128.6, 133.5, 135.4, 146.6, 171.5 (quart. C); C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (357.20); ber. C 57.16, H 3.67, N 7.84; gef. C 55.42, H 3.75, N 6.79; MS (EI):  $m/z$  (%) = 356 [M]<sup>+</sup> (100), 358 [M]<sup>+</sup> (90); HRMS (EI):  $m/z$  [M]<sup>+</sup> ber. 356.01550; gef. 356.01582; HPLC: 99.2% bei 254 nm und 97.1% bei 280 nm,  $t_N$  = 3.10 min,  $t_M$  = 1.03 min (ACN/H<sub>2</sub>O; 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$ : 230 nm, 310 nm und 393 nm.

#### 11-Methoxy-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)on (**20b**)

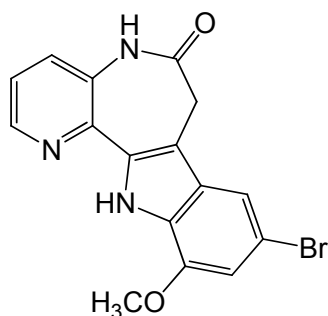


3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-5-[(2-methoxyphenyl)hydrazon] (**47b**; 75 mg, 0.25 mmol) werden in Diphenylether (27 ml) unter Stickstoffbegasung für 1 h zum Reflux erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird in *n*-Hexan (45 ml) gegossen. Ein entstandener Niederschlag wird isoliert, mit Petrolether gewaschen und aus Ethanol 96% umkristallisiert. Es werden 5 mg (7%) eines dunkelbraunen Pulvers erhalten.

Schmp.: 228-233 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3325 cm<sup>-1</sup> und 3196 cm<sup>-1</sup> (NH), 3052 cm<sup>-1</sup> (CH aromatisch), 2970 cm<sup>-1</sup> (CH aliphatisch), 1653 cm<sup>-1</sup> (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.96 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.76 (d, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, ArH), 7.01 (dd, 1H,  $J$  = 7.9/7.8 Hz, ArH), 7.21-7.25 (m, 3H, ArH), 7.33-7.36 (m, 1H, ArH), 7.85 (dd, 1H,  $J$  = 7.7/1.3 Hz, ArH), 10.07 (s, 1H, NH), 11.61 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.4 (OCH<sub>3</sub>); 32.0 (sek. C); 102.9, 110.9, 120.0, 122.4, 123.8, 127.9, 128.1 (tert. C); 108.6, 123.2, 127.8, 128.2, 132.6, 135.6, 146.4, 172.0 (quart. C); C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (278.31); MS (EI):  $m/z$  (%) = 278 [M]<sup>+</sup> (100); HRMS (EI):

$m/z$   $[M-H]^+$  ber. 277.09717; gef. 277.09726; HPLC: 97.3% bei 254 nm und 97.0% bei 280 nm,  $t_N$  = 4.01 min,  $t_M$  = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 40:60),  $\lambda_{max}$ : 232 nm, 306 nm und 374 nm.

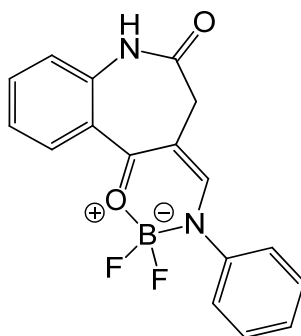
9-Brom-11-methoxy-7,12-dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (21a)



7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-[(4-brom-2-methoxyphenyl)hydrazon] (**48a**; 112 mg, 0.300 mmol) wird in Diphenylether (27 ml) unter Stickstoffbegasung für 3 h refluxiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird in *n*-Hexan (45 ml) gegossen. Ein entstandener Niederschlag wird isoliert und mit Petrolether gewaschen. Nach der Umkristallisation aus Ethanol 96%/Toluol (1:1) werden 24 mg (22%) eines hellbraunen Pulvers erhalten.

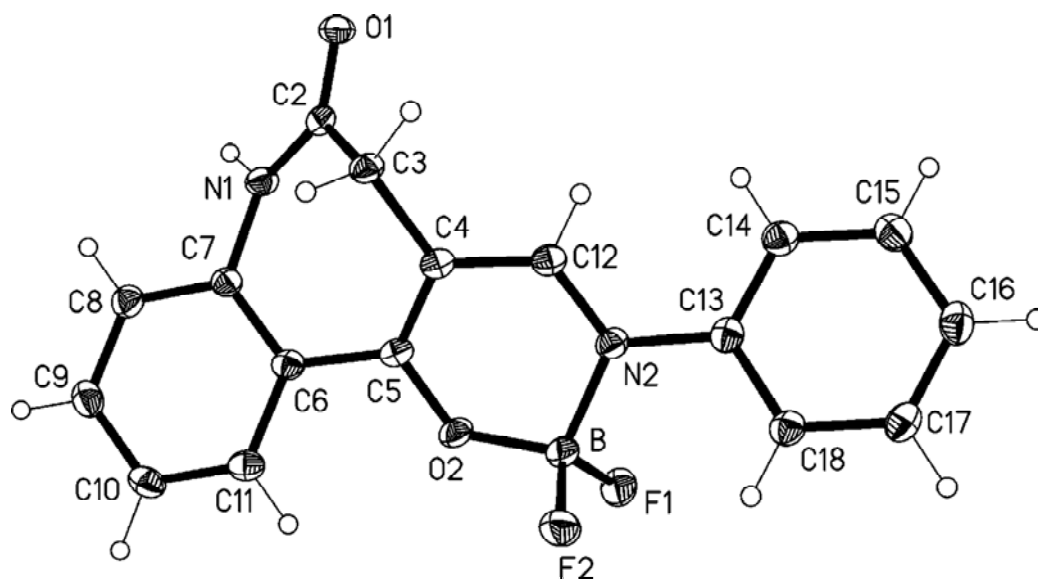
Schmp.: ab 277 °C Zersetzung; IR (KBr): 3426  $\text{cm}^{-1}$  und 3186  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3057  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2966  $\text{cm}^{-1}$  und 2929  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1672  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.59 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.95 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.89 (d, 1H,  $J$  = 1.6 Hz, ArH), 7.41 (dd, 1H,  $J$  = 8.2/4.5 Hz, ArH), 7.55-7.56 (m, 1H, ArH), 7.61 (dd, 1H,  $J$  = 8.2/1.5 Hz, ArH), 8.48 (dd, 1H,  $J$  = 4.5/1.5 Hz, ArH), 10.21 (s, 1H, NH), 11.76 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.7 ( $\text{OCH}_3$ ); 31.6 (sek. C); 106.5, 113.5, 122.7, 129.4, 144.4 (tert. C); 109.5, 111.7, 126.6, 128.4, 132.2, 133.5, 140.3, 146.9, 171.2 (quart. C);  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrN}_3\text{O}_2$  (358.19); ber. C 53.65, H 3.38, N 11.73; gef. C 53.31, H 3.30, N 11.32; MS (EI):  $m/z$  (%) = 357  $[M]^+$  (98), 359  $[M]^+$  (100); HRMS (EI):  $m/z$   $[M]^+$  ber. 357.01074; gef. 357.01130; HPLC: 95.2% bei 254 nm und 95.8% bei 280 nm,  $t_N$  = 3.30 min,  $t_M$  = 1.02 min (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ ; 45:55),  $\lambda_{max}$ : 224 nm und 327 nm.

Difluoro-{(4*Z*)-4-[(phenylamino- $\kappa$ N)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-bor (22a)



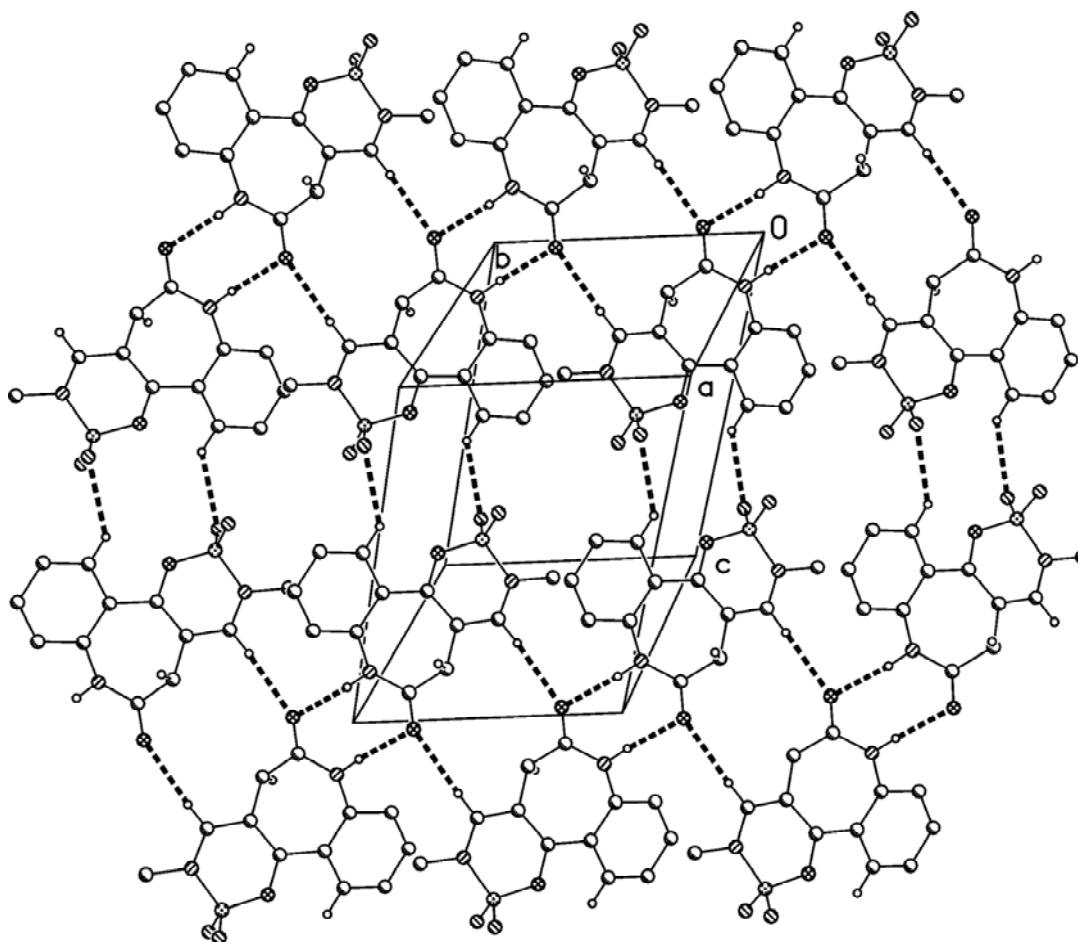
Nach AAV 1 aus (4*EZ*)-4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54a**; 139 mg, 0.500 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (85  $\mu$ l, 0.50 mmol) und Bor-trifluorid-Etherat (0.317 ml, 2.50 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 73 mg (45%) gelbe Kristalle erhalten.

Schmp.: 277-279 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3293  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3064  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2982  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1679  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.23 (s, 2H, azepin.  $\text{CH}_2$ ), 7.25 (dd, 1H,  $J = 8.2/1.1$  Hz, ArH), 7.33 (ddd, 1H,  $J = 7.9/7.3/1.1$  Hz, ArH), 7.45 (dd, 1H,  $J = 7.3/1.1$  Hz, ArH), 7.52-7.54 (m, 2H, ArH), 7.57-7.59 (m, 2H, ArH), 7.64 (ddd, 1H,  $J = 8.2/7.3/1.6$  Hz, ArH), 7.88 (dd, 1H,  $J = 7.9/1.6$  Hz, ArH), 8.59 (s, 1H, CH), 10.51 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 33.7 (sek. C); 122.0, 123.2 (2C), 123.8, 128.1, 129.1, 129.4 (2C), 133.4, 162.9 (tert. C); 103.5, 124.2, 138.8, 141.8, 167.3, 171.8 (quart. C);  $^{11}\text{B}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 96.3 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.84 (breites t, 1B);  $^{19}\text{F}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 376.4 MHz):  $\delta$  (ppm) = (-129.87)-(-129.80) (breites m, 2F);  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$  (326.11); ber. C 62.61, H 4.02, N 8.59; gef. C 62.69, H 4.10, N 8.62; HPLC: 97.8% bei 254 nm, 97.1% bei 280 nm und 98.0% bei 380 nm,  $t_N = 5.74$  min,  $t_M = 1.09$  min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 40:60),  $\lambda_{\text{max}}$ : 225 nm und 369 nm.



**Abbildung 8-1:** Röntgenkristallstruktur von **22a**<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.



**Abbildung 8-2:** Röntgenkristallstruktur des Kristallgitters von **22a**<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Die *N*-Phenylreste sind der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Tabelle 8-1: Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	$C_{17}H_{13}BF_2N_2O_2$
$M_r$	326.10
Temperatur	100(2) K
Wellenlänge	1.54184 Å
Kristallsystem	Triclinic
Raumgruppe	P(-1)
Gitterkonstanten	$a = 7.9731(8) \text{ Å}$ $\alpha = 79.418(7)^\circ$ $b = 8.2512(8) \text{ Å}$ $\beta = 80.370(7)^\circ$ $c = 11.8523(8) \text{ Å}$ $\gamma = 69.917(9)^\circ$
Volumen	$715.27(11) \text{ Å}^3$
Z	2
Dichte (berechnet)	$1.514 \text{ Mg/m}^3$
Absorptionskoeffizient	$0.987 \text{ mm}^{-1}$
F(000)	336
Kristallgröße	$0.4 \times 0.1 \times 0.02 \text{ mm}^3$
$\Theta$ -Bereich für die Datensammlung	3.82 bis $75.84^\circ$
Limitierende Indices	$-9 \leq h \leq 9$ , $-10 \leq k \leq 10$ , $-14 \leq l \leq 14$
Zahl der Reflexe	26134
Unabhängige Reflexe	2959 [R(int) = 0.0367]
Vollständigkeit bis $\Theta = 75.00^\circ$	99.8%
Absorptionskorrektur	Semi-empirical from equivalents
Max. und Min. Transmission	1.00000 and 0.53552
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on $F^2$
Daten/Einschränkungen/Parameter	2959 / 0 / 221
Goodness-of-fit on $F^2$	1.095
Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R1 = 0.0337$ , $wR2 = 0.0886$
R indices (alle Daten)	$R1 = 0.0353$ , $wR2 = 0.0898$
Größte Differenzpeaks	0.268 und $-0.217 \text{ e.Å}^{-3}$

**Tabelle 8-2:** Atomkoordinaten ( $\times 10^4$ ) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ )<sup>a,b,c</sup>

	x	y	z	U(eq)
N(1)	458.5(13)	225.3(12)	1390.8(8)	17.6(2)
C(2)	-37.8(14)	1928.3(14)	941.8(9)	16.4(2)
C(3)	-216.0(14)	3216.2(14)	1743.6(9)	17.2(2)
C(4)	1529.7(14)	2924.4(14)	2213.1(9)	16.5(2)
C(5)	2326.5(14)	1420.6(14)	2928.2(9)	16.4(2)
C(6)	1639.3(14)	-49.1(14)	3262.1(9)	16.5(2)
C(7)	698.9(14)	-531.5(14)	2548.0(9)	16.3(2)
C(8)	87.2(15)	-1951.1(15)	2939.7(10)	19.7(2)
C(9)	394.5(16)	-2897.8(15)	4021.1(10)	21.6(2)
C(10)	1357.6(15)	-2456.5(15)	4724.8(10)	21.0(2)
C(11)	1967.4(15)	-1051.8(14)	4348.5(10)	18.9(2)
C(12)	2345.2(14)	4235.6(14)	1948.0(9)	16.8(2)
C(13)	4521.8(14)	5552.4(14)	2113.2(10)	17.7(2)
C(14)	4528.2(15)	6453.8(15)	994.1(10)	20.5(2)
C(15)	5309.7(16)	7762.1(16)	712.9(10)	23.0(2)
C(16)	6061.1(16)	8201.9(15)	1542.1(11)	23.2(3)
C(17)	6025.1(15)	7322.0(15)	2659.9(10)	21.6(2)
C(18)	5280.3(15)	5989.3(15)	2947.4(10)	19.0(2)
N(2)	3744.3(12)	4177.3(12)	2431.1(8)	17.0(2)
O(1)	-347.6(11)	2381.4(10)	-77.6(7)	21.1(2)
O(2)	3795.3(10)	1225.6(10)	3382.8(7)	19.6(2)
B	4501.3(17)	2640.1(17)	3408.9(11)	19.2(3)
F(1)	6346.1(9)	2018.7(9)	3201.2(7)	27.3(2)
F(2)	3947.0(10)	3221.5(9)	4475.7(6)	27.4(2)

<sup>a</sup> Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup> Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

<sup>c</sup> U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten  $U_{ij}$  Tensors.

Tabelle 8-3: Bindungslängen [Å]<sup>a,b</sup>

N(1)-C(2)	1.3522(14)	N(1)-C(2)	1.3522(14)
N(1)-C(7)	1.4138(14)	N(1)-C(7)	1.4138(14)
C(2)-O(1)	1.2373(13)	C(2)-O(1)	1.2373(13)
C(2)-C(3)	1.5081(15)	C(2)-C(3)	1.5081(15)
C(3)-C(4)	1.5115(14)	C(3)-C(4)	1.5115(14)
C(4)-C(5)	1.3835(15)	C(4)-C(5)	1.3835(15)
C(4)-C(12)	1.4078(15)	C(4)-C(12)	1.4078(15)
C(5)-O(2)	1.3181(13)	C(5)-O(2)	1.3181(13)
C(5)-C(6)	1.4611(15)	C(5)-C(6)	1.4611(15)
C(6)-C(7)	1.4065(15)	C(6)-C(7)	1.4065(15)
C(6)-C(11)	1.4084(15)	C(6)-C(11)	1.4084(15)
C(7)-C(8)	1.3936(15)	C(7)-C(8)	1.3936(15)
C(8)-C(9)	1.3852(16)	C(8)-C(9)	1.3852(16)
C(9)-C(10)	1.3913(17)	C(9)-C(10)	1.3913(17)

<sup>a</sup> Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup> Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 8-4: Bindungswinkel [°]<sup>a,b</sup>

C(2)-N(1)-C(7)	128.84(10)	C(2)-N(1)-C(7)	128.84(10)
O(1)-C(2)-N(1)	120.53(10)	O(1)-C(2)-N(1)	120.53(10)
O(1)-C(2)-C(3)	122.59(10)	O(1)-C(2)-C(3)	122.59(10)
N(1)-C(2)-C(3)	116.87(9)	N(1)-C(2)-C(3)	116.87(9)
C(2)-C(3)-C(4)	112.42(9)	C(2)-C(3)-C(4)	112.42(9)
C(5)-C(4)-C(12)	118.79(10)	C(5)-C(4)-C(12)	118.79(10)
C(5)-C(4)-C(3)	121.78(10)	C(5)-C(4)-C(3)	121.78(10)
C(12)-C(4)-C(3)	119.41(9)	C(12)-C(4)-C(3)	119.41(9)
O(2)-C(5)-C(4)	121.09(10)	O(2)-C(5)-C(4)	121.09(10)
O(2)-C(5)-C(6)	114.35(9)	O(2)-C(5)-C(6)	114.35(9)
C(4)-C(5)-C(6)	124.55(10)	C(4)-C(5)-C(6)	124.55(10)
C(7)-C(6)-C(11)	118.44(10)	C(7)-C(6)-C(11)	118.44(10)
C(7)-C(6)-C(5)	123.46(10)	C(7)-C(6)-C(5)	123.46(10)
C(11)-C(6)-C(5)	118.08(10)	C(11)-C(6)-C(5)	118.08(10)
C(8)-C(7)-C(6)	119.53(10)	C(8)-C(7)-C(6)	119.53(10)

Tabelle 8-4: Bindungswinkel [ $^{\circ}$ ]<sup>a,b</sup> (Fortsetzung)

C(8)-C(7)-N(1)	115.79(10)	C(8)-C(7)-N(1)	115.79(10)
C(6)-C(7)-N(1)	124.41(10)	C(6)-C(7)-N(1)	124.41(10)
C(9)-C(8)-C(7)	121.03(11)	C(9)-C(8)-C(7)	121.03(11)
C(8)-C(9)-C(10)	119.95(11)	C(8)-C(9)-C(10)	119.95(11)
C(11)-C(10)-C(9)	119.60(10)	C(11)-C(10)-C(9)	119.60(10)

<sup>a</sup> Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup> Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 8-5: Torsionswinkel [ $^{\circ}$ ]<sup>a,b</sup>

C(7)-N(1)-C(2)-O(1)	-173.28(10)	C(7)-N(1)-C(2)-O(1)	-173.28(10)
C(7)-N(1)-C(2)-C(3)	5.80(16)	C(7)-N(1)-C(2)-C(3)	5.80(16)
O(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-120.33(11)	O(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-120.33(11)
N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	60.61(13)	N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	60.61(13)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-64.71(13)	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-64.71(13)
C(2)-C(3)-C(4)-C(12)	117.29(11)	C(2)-C(3)-C(4)-C(12)	117.29(11)
C(12)-C(4)-C(5)-O(2)	1.83(16)	C(12)-C(4)-C(5)-O(2)	1.83(16)
C(3)-C(4)-C(5)-O(2)	-176.19(9)	C(3)-C(4)-C(5)-O(2)	-176.19(9)
C(12)-C(4)-C(5)-C(6)	-179.23(10)	C(12)-C(4)-C(5)-C(6)	-179.23(10)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	2.76(16)	C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	2.76(16)
O(2)-C(5)-C(6)-C(7)	-149.58(10)	O(2)-C(5)-C(6)-C(7)	-149.58(10)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	31.42(16)	C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	31.42(16)
O(2)-C(5)-C(6)-C(11)	29.21(14)	O(2)-C(5)-C(6)-C(11)	29.21(14)
C(4)-C(5)-C(6)-C(11)	-149.79(11)	C(4)-C(5)-C(6)-C(11)	-149.79(11)
C(11)-C(6)-C(7)-C(8)	1.41(15)	C(11)-C(6)-C(7)-C(8)	1.41(15)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-179.81(10)	C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-179.81(10)
C(11)-C(6)-C(7)-N(1)	-172.30(10)	C(11)-C(6)-C(7)-N(1)	-172.30(10)
C(5)-C(6)-C(7)-N(1)	6.48(17)	C(5)-C(6)-C(7)-N(1)	6.48(17)
C(2)-N(1)-C(7)-C(8)	140.18(11)	C(2)-N(1)-C(7)-C(8)	140.18(11)
C(2)-N(1)-C(7)-C(6)	-45.90(17)	C(2)-N(1)-C(7)-C(6)	-45.90(17)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-0.15(16)	C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-0.15(16)
N(1)-C(7)-C(8)-C(9)	174.08(10)	N(1)-C(7)-C(8)-C(9)	174.08(10)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	-1.27(17)	C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	-1.27(17)



Tabelle 8-5: Torsionswinkel [ $^{\circ}$ ]<sup>a,b</sup> (Fortsetzung)

C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	1.38(17)	C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	1.38(17)
C(9)-C(10)-C(11)-C(6)	-0.10(17)	C(9)-C(10)-C(11)-C(6)	-0.10(17)
C(7)-C(6)-C(11)-C(10)	-1.29(16)	C(7)-C(6)-C(11)-C(10)	-1.29(16)
C(5)-C(6)-C(11)-C(10)	179.85(10)	C(5)-C(6)-C(11)-C(10)	179.85(10)

<sup>a</sup> Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup> Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 8-6: Wasserstoffbrückenbindungen [ $\text{\AA}$  und  $^{\circ}$ ]<sup>a,b</sup>

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(1)-H(01)...O(1)#1	0.883(17)	2.028(17)	2.9092(13)	175.4(14)
C(12)-H(12)...O(1)#2	0.95	2.39	3.3314(14)	173.8
C(3)-H(3A)...F(1)#3	0.99	2.45	3.3352(14)	147.9
C(11)-H(11)...F(1)#4	0.95	2.52	3.2554(13)	134.2
C(18)-H(18)...F(2)	0.95	2.35	3.0216(14)	127.6

Benutzte Symmetrietransformationen für die Generierung äquivalenter Atome:

#1 -x,-y,-z

#2 -x,-y+1,-z

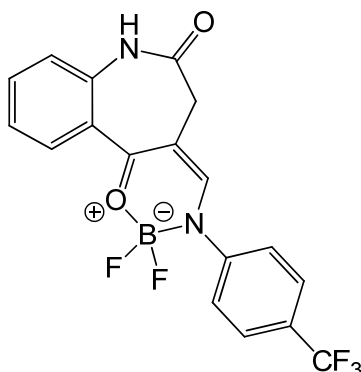
#3 x-1,y,z

#4 -x+1,-y,-z+1

<sup>a</sup> Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup> Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

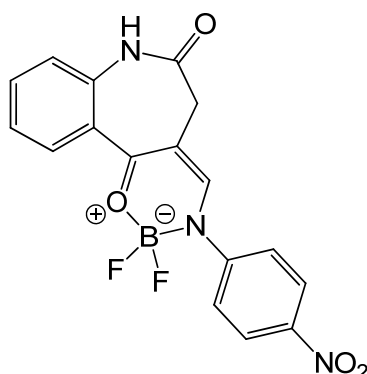
Difluoro-{(4*Z*)-4-{[4-(trifluoromethyl)(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden}-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-bor (22b)



Nach AAV 1 aus (4*EZ*)-4-{[4-(Trifluoromethyl)anilino]methyliden}-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54b**; 59 mg, 0.17 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (29  $\mu$ l, 0.17 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (0.107 ml, 0.850 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 30 mg (45%) eines weiß-gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 238-240 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3211  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3083  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2977  $\text{cm}^{-1}$  und 2922  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1686  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.25 (s, 2H, azepin.  $\text{CH}_2$ ), 7.26 (dd, 1H,  $J = 8.2/1.0$  Hz, ArH), 7.34 (ddd, 1H,  $J = 7.9/7.3/1.1$  Hz, ArH), 7.66 (ddd, 1H,  $J = 8.2/7.3/1.6$  Hz, ArH), 7.82-7.84 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.89 (dd, 1H,  $J = 7.9/1.6$  Hz, ArH), 7.92-7.94 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.68 (s, 1H, CH), 10.54 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 33.8 (sek. C); 122.0, 123.8, 124.1 (2C), 126.6 (q, 2C,  $^3J_{\text{C,F}} = 3.6$  Hz,  $\underline{\text{C}}\text{-C-CF}$ ), 129.2, 133.7, 163.6 (tert. C); 103.9, 123.9 (q,  $^1J_{\text{C,F}} = 272.0$  Hz,  $\underline{\text{C}}\text{-F}$ ), 124.0, 128.2 (q,  $^2J_{\text{C,F}} = 32.3$  Hz,  $\underline{\text{C}}\text{-CF}$ ), 139.0, 144.9, 168.6, 171.7 (quart. C);  $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{BF}_5\text{N}_2\text{O}_2$  (394.10); ber. C 54.86, H 3.07, N 7.11; gef. C 56.13, H 3.51, N 6.79; MS (EI):  $m/z$  (%) = 394  $[\text{M}]^{+}$  (100), 393  $[\text{M}]^{+}$  (28); HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^{+}$  ber. 393.09482; gef. 393.09280; HPLC: 98.0% bei 254 nm, 94.4% bei 280 nm und 99.2% bei 380 nm,  $t_{\text{N}} = 3.46$  min,  $t_{\text{M}} = 1.09$  min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$ : 225 nm und 374 nm.

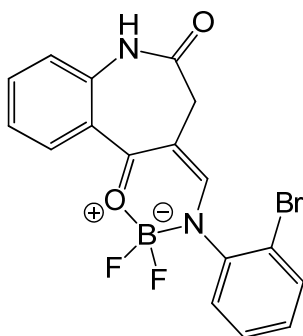
Difluoro-{(4*Z*)-4-[[4-nitro(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-bor (**22c**)



Nach AAV 1 aus (4*EZ*)-4-[(4-Nitroanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54c**; 113 mg, 0.350 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (60  $\mu$ l, 0.35 mmol) und Bor-trifluorid-Etherat (0.222 ml, 1.75 mmol). Reaktionsdauer: 12 h. Nach Umkristallisation aus Toluol und anschließender Umkristallisation aus Dichlormethan werden 30 mg (23%) eines orangefarbenen Pulvers erhalten.

Schmp.: 239-242 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3214  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3114  $\text{cm}^{-1}$ , 3079  $\text{cm}^{-1}$  und 3050  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2971  $\text{cm}^{-1}$  und 2914  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1684  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.27 (s, 2H, azepin.  $\text{CH}_2$ ), 7.26 (dd, 1H,  $J$  = 8.2/1.0 Hz, ArH), 7.34 (ddd, 1H,  $J$  = 7.9/7.3/1.1 Hz, ArH), 7.67 (ddd, 1H,  $J$  = 8.2/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.87-7.89 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems) überlagert mit 7.90 (dd, 1H,  $J$  = 7.9/1.6 Hz, ArH), 8.39-8.41 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.73 (s, 1H, CH), 10.56 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 33.8 (sek. C); 122.0, 123.9, 124.2 (2C), 124.9 (2C), 129.3, 133.9, 163.6 (tert. C); 104.2, 123.9, 139.1, 146.3, 146.8, 169.4, 171.6 (quart. C);  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_4$  (371.10); ber. C 55.02, H 3.26, N 11.32; gef. C 54.07, H 3.42, N 10.95; MS (EI):  $m/z$  (%) = 371 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup> (100), 370 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup> (25); HRMS (EI):  $m/z$  [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup> ber. 370.09250; gef. 370.09127; HPLC: 98.8% bei 254 nm, 96.8% bei 280 nm und 98.9% bei 380 nm,  $t_N$  = 3.93 min,  $t_M$  = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 45:55),  $\lambda_{\text{max}}$ : 224 nm und 388 nm.

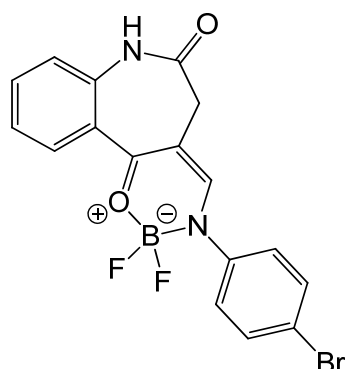
{(4Z)-4-[(2-Brom(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden)-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-difluorobor (**22d**)



Nach AAV 1 aus (4Z)-4-[(2-Bromanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**54d**; 107 mg, 0.300 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (51  $\mu$ l, 0.30 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (0.190 ml, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 6 h. Nach Umkristallisation aus Toluol und anschließender Umkristallisation aus Dichlormethan werden 19 mg (16%) eines weiß-gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 264-266 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3206  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3122  $\text{cm}^{-1}$  und 3057  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2986  $\text{cm}^{-1}$  und 2964  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1684  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.22 (s, 2H, azepin.  $\text{CH}_2$ ), 7.26 (dd, 1H,  $J$  = 8.2/0.8 Hz, ArH), 7.34 (ddd, 1H,  $J$  = 7.9/7.3/1.1 Hz, ArH), 7.43 (ddd, 1H,  $J$  = 7.9/6.8/2.2 Hz, ArH), 7.51-7.56 (m, 2H, ArH), 7.66 (ddd, 1H,  $J$  = 8.2/7.3/1.5 Hz, ArH), 7.85 (dd, 1H,  $J$  = 7.9/1.1 Hz), 7.89 (dd, 1H,  $J$  = 8.0/1.5 Hz, ArH), 8.55 (s, 1H, CH), 10.53 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 33.4 (sek. C); 122.0, 123.9, 127.4, 128.4, 129.2, 130.2, 133.5, 133.6, 166.6 (tert. C); 102.7, 119.2, 124.2, 138.9, 140.1, 168.7, 171.7 (quart. C);  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{BBrF}_2\text{N}_2\text{O}_2$  (405.00); ber. C 50.42, H 2.99, N 6.92; gef. C 50.12, H 2.89, N 7.14; HPLC: 98.7% bei 254 nm, 97.6% bei 280 nm und 98.9% bei 380 nm,  $t_N$  = 3.69 min,  $t_M$  = 1.07 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 45:55),  $\lambda_{\text{max}}$ : 359 nm.

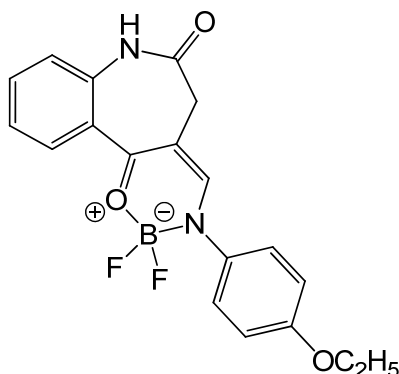
{(4*Z*)-4-[4-Brom(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden}-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-difluorobor (**22f**)



Nach AAV 1 aus (4*EZ*)-4-[(4-Bromanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54f**, 107 mg, 0.300 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (51  $\mu$ l, 0.30 mmol) und Bor-trifluorid-Etherat (0.190 ml, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 45 min. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 30 mg (25%) gelbe Kristalle erhalten.

Schmp.: 285-287 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3227  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3057  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2986  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1685  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.22 (s, 2H, azepin.  $\text{CH}_2$ ), 7.25 (dd, 1H,  $J = 8.2/1.0$  Hz, ArH), 7.32 (ddd, 1H,  $J = 8.0/7.3/1.1$  Hz, ArH), 7.54-7.57 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.64 (ddd, 1H,  $J = 8.2/7.3/1.6$  Hz, ArH), 7.73-7.75 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.87 (dd, 1H,  $J = 8.0/1.6$  Hz, ArH), 8.60 (s, 1H, CH), 10.51 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 33.7 (sek. C); 122.0, 123.8, 125.3 (2C), 129.1, 132.2 (2C), 133.5, 167.8 (tert. C); 103.6, 121.0, 124.1, 138.8, 141.0, 163.0, 171.7 (quart. C);  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{BBrF}_2\text{N}_2\text{O}_2$  (405.00); ber. C 50.42, H 2.99, N 6.92; gef. C 50.62, H 2.96, N 6.79; HPLC: 96.1% bei 254 nm, 95.6% bei 280 nm und 95.2% bei 380 nm,  $t_N = 6.38$  min,  $t_M = 1.07$  min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 45:55),  $\lambda_{\text{max}}$ : 225 nm und 376 nm.

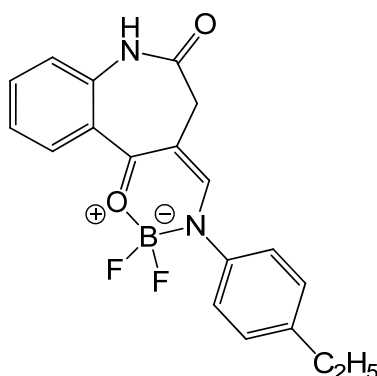
{(4Z)-4-[[4-Ethoxy(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5-</sup>}-difluorobor (**22g**)



Nach AAV 1 aus (4EZ)-4-[(Ethoxyanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**54g**; 97 mg, 0.30 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (51  $\mu$ l, 0.30 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (0.190 ml, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 51 mg (46%) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 234-236 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3215  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3068  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2979  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1677  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.35 (t, 3H,  $J$  = 6.8 Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3.20 (s, 2H, azepin. C), 4.08 (q, 2H,  $J$  = 6.8 Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 7.04-7.06 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.24 (dd, 1H,  $J$  = 8.2/1.0 Hz, ArH), 7.30-7.33 (m, 1H, ArH), 7.49-7.51 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.62 (ddd, 1H,  $J$  = 8.1/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.86 (dd, 1H,  $J$  = 8.0/1.6 Hz, ArH), 8.51 (s, 1H, CH), 10.48 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 14.5 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ); 33.7 (azepin.  $\text{CH}_2$ ), 63.4 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ); 114.8 (2C), 121.9, 123.8, 124.3 (2C), 128.9, 133.1, 161.8 (tert. C); 103.3, 134.7, 138.6, 158.2, 166.3, 171.8 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 256 Scans);  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_3$  (370.16); ber. C 61.65, H 4.63, N 7.57; gef. C 61.34, H 4.61, N 7.43; HPLC: 97.4% bei 254 nm, 96.5% bei 280 nm und 97.7% bei 380 nm,  $t_N$  = 5.27 min,  $t_M$  = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 45:55),  $\lambda_{\text{max}}$ : 230 nm und 311 nm.

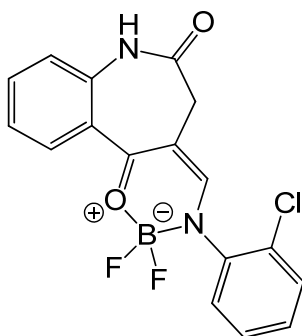
{(4Z)-4-[4-Ethyl(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden}-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-difluorobor (**22h**)



Nach AAV 1 aus (4EZ)-4-[(Ethylanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**54h**; 92 mg, 0.30 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (51  $\mu$ l, 0.30 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (0.190 ml, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 66 mg (62%) gelbe Kristalle erhalten.

Schmp.: 238-240 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3213  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3121  $\text{cm}^{-1}$ , 3071  $\text{cm}^{-1}$  und 3036  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2974  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1678  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 1.21 (t, 3H,  $J$  = 7.5 Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 2.66 (q, 2H,  $J$  = 7.5 Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 3.21 (s, 2H, azepin.  $\text{CH}_2$ ), 7.24 (dd, 1H,  $J$  = 8.2/1.0 Hz, ArH), 7.32 (ddd, 1H,  $J$  = 8.0/7.3/1.1 Hz, ArH), 7.35-7.36 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.48-7.49 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.63 (ddd, 1H,  $J$  = 8.2/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.87 (dd, 1H,  $J$  = 8.1/1.6 Hz, ArH), 8.55 (s, 1H, CH), 10.50 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 15.4 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ); 27.6 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 33.7 (azepin. C); 121.9, 123.0 (2C), 123.8, 128.6 (2C), 129.0, 133.2, 162.4 (tert. C); 103.4, 124.3, 138.7, 139.5, 144.0, 166.9, 171.8 (quart. C);  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$  (354.16); ber. C 64.44, H 4.84, N 7.91; gef. C 64.30, H 4.96, N 7.84; HPLC: 98.8% bei 254 nm, 96.7% bei 280 nm und 98.5% bei 380 nm,  $t_N$  = 2.66 min,  $t_M$  = 1.07 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 55:45),  $\lambda_{\text{max}}$ : 225 nm und 374 nm.

{(4Z)-4-[[2-Chlor(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5-</sup>]-difluorobor (22i)}

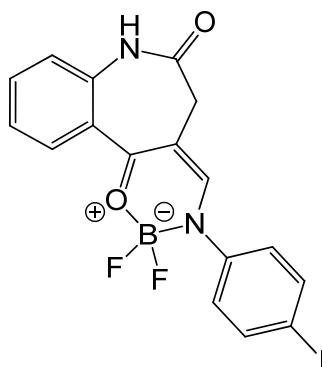


Nach AAV 1 aus (4Z)-4-[(2-Chloranilino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**54i**; 63 mg, 0.20 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (34  $\mu$ l, 0.20 mmol) und Bor-trifluorid-Etherat (0.127 ml, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 4.5 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 30 mg (42%) eines weiß-gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 266-268 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3209  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3121  $\text{cm}^{-1}$  und 3057  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2986  $\text{cm}^{-1}$  und 2964  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1684  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.21 (s, 2H, azepin.  $\text{CH}_2$ ), 7.26 (dd, 1H,  $J$  = 8.2/1.0 Hz, ArH), 7.34 (ddd, 1H,  $J$  = 8.0/7.3/1.1 Hz, ArH), 7.49-7.55 (m, 3H, ArH), 7.66 (ddd, 1H,  $J$  = 8.2/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.69-7.72 (m, 1H, ArH), 7.89 (dd, 1H,  $J$  = 8.0/1.6 Hz, ArH), 8.57 (s, 1H, CH), 10.53 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 33.5 (sek. C); 122.0, 123.9, 127.6, 127.9, 129.2, 130.0, 130.3, 133.6, 166.5 (tert. C); 102.7, 124.2, 128.8, 138.6, 138.9, 168.7, 171.7 (quart. C);  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{BClF}_2\text{N}_2\text{O}_2$  (360.55); ber. C 56.63, H 3.35, N 7.77; gef. C 56.33, H 3.28, N 7.52; HPLC: 99.2% bei 254 nm, 97.1% bei 280 nm und 99.2% bei 380 nm,  $t_N$  = 3.45 min,  $t_M$  = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 45:55),  $\lambda_{\text{max}}$ : 359 nm.



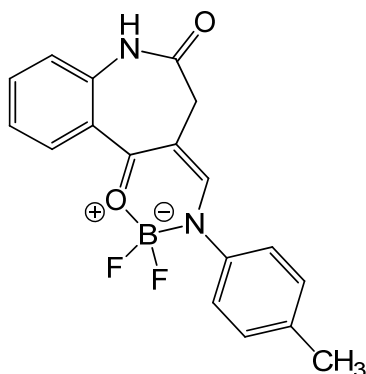
Difluoro-{(4*Z*)-4-{[4-iod(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden}-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-bor (22j)



Nach AAV 1 aus (4*EZ*)-4-[(4-Iodanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54j**; 101 mg, 0.250 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (43  $\mu$ l, 0.25 mmol) und Bor-trifluorid-Etherat (0.158 ml, 1.25 mmol). Reaktionsdauer: 3.5 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 34 mg (30%) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 299-301 °C; IR (KBr): 3237  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3057  $\text{cm}^{-1}$  und 3036  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2986  $\text{cm}^{-1}$  und 2964  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1684  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.22 (s, 2H, azepin.  $\text{CH}_2$ ), 7.24 (dd, 1H,  $J$  = 8.2/1.0 Hz, ArH), 7.32 (ddd, 1H,  $J$  = 7.9/7.3/1.1 Hz, ArH), 7.39-7.41 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.64 (ddd, 1H,  $J$  = 8.2/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.87 (dd, 1H,  $J$  = 8.0/1.6 Hz, ArH) überlagert mit 7.88-7.90 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 8.59 (s, 1H, CH), 10.52 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 33.7 (sek. C); 122.0, 123.8, 125.3 (2C), 129.1, 133.5, 138.1 (2C), 162.8 (tert. C); 94.1, 103.7, 124.2, 138.8, 141.4, 167.7, 171.8 (quart. C);  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{BF}_2\text{IN}_2\text{O}_2$  (452.00); ber. C 45.17, H 2.68, N 6.20; gef. C 45.73, H 2.76, N 6.45; MS (EI):  $m/z$  (%) = 452  $[\text{M}]^+$  (100), 451  $[\text{M}]^+$  (25); HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$  ber. 451.00412; gef. 451.00252; HPLC: 96.8% bei 254 nm, 95.9% bei 280 nm und 96.7% bei 380 nm,  $t_N$  = 3.50 min,  $t_M$  = 1.10 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$ : 226 nm und 378 nm.

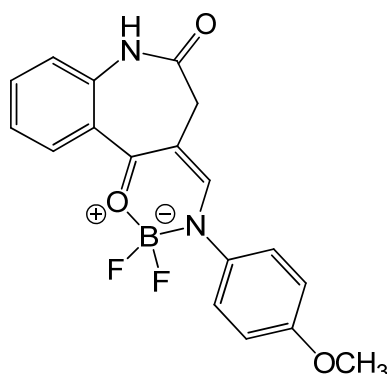
Difluoro-{(4*Z*)-4-{[4-methyl(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden}-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-bor (22k)



Nach AAV 1 aus (4*EZ*)-4-(Toluidinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54k**; 88 mg, 0.30 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (51  $\mu$ l, 0.30 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (0.190 ml, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 53 mg (52%) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 239-241 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3233  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3050  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2929  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1686  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.22 (s, 2H, azepin. CH<sub>2</sub>), 7.24 (dd, 1H,  $J$  = 8.2/0.8 Hz, ArH), 7.30-7.33 (m, 3H, ArH), 7.46-7.47 (m, 2H, ArH), 7.63 (ddd, 1H,  $J$  = 8.2/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.87 (dd, 1H,  $J$  = 8.0/1.6 Hz, ArH), 8.55 (s, 1H, CH), 10.49 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 20.5 (prim. C), 33.7 (sek. C); 121.9, 122.9 (2C), 123.8, 129.0, 129.7 (2C), 133.2, 162.3 (tert. C); 103.4, 124.3, 137.7, 138.7, 139.3, 166.9, 171.8 (quart. C); C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (340.13); ber. C 63.56, H 4.44, N 8.24; gef. C 63.43, H 4.54, N 8.21; HPLC: 98.6% bei 254 nm, 97.7% bei 280 nm und 99.8% bei 380 nm,  $t_N$  = 8.47 min,  $t_M$  = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 40:60),  $\lambda_{\text{max}}$ : 225 nm und 374 nm.

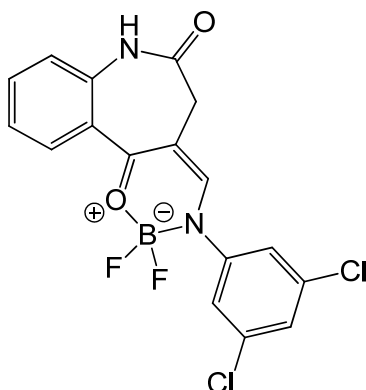
Difluoro-{(4*Z*)-4-[[4-methoxy(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-bor (**22I**)



Nach AAV 1 aus (4*EZ*)-4-[(4-Methoxyanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54I**; 93 mg, 0.30 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (51  $\mu$ l, 0.30 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (0.190 ml, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 57 mg (53%) gelbe Kristalle erhalten.

Schmp.: 252-254 °C; IR (KBr): 3240  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3036  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2964  $\text{cm}^{-1}$  und 2929  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1681  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.21 (s, 2H, azepin.  $\text{CH}_2$ ), 3.81 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.06-7.08 (m, 2H, ArH, Teil eines  $\text{AA}'\text{XX}'$ -Systems), 7.24 (dd, 1H,  $J = 8.2/1.0$  Hz, ArH), 7.32 (ddd, 1H,  $J = 8.0/7.3/1.1$  Hz, ArH), 7.50-7.53 (m, 2H, ArH, Teil eines  $\text{AA}'\text{XX}'$ -Systems), 7.62 (ddd, 1H,  $J = 8.2/7.3/1.6$  Hz, ArH), 7.86 (dd, 1H,  $J = 8.0/1.6$  Hz, ArH), 8.51 (s, 1H, CH), 10.48 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.4 ( $\text{OCH}_3$ ); 33.7 (sek. C); 114.4 (2C), 121.9, 123.8, 124.3 (2C), 128.9, 133.1, 161.9 (tert. C); 103.3, 134.8, 138.6, 158.9, 166.3, 171.8 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 512 Scans);  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_3$  (356.13); ber. C 60.71, H 4.25, N 7.87; gef. C 60.69, H 4.29, N 7.82; HPLC: 97.8% bei 254 nm, 97.3% bei 280 nm und 98.3% bei 380 nm,  $t_N = 6.39$  min,  $t_M = 1.09$  min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 40:60),  $\lambda_{\text{max}}$ : 309 nm.

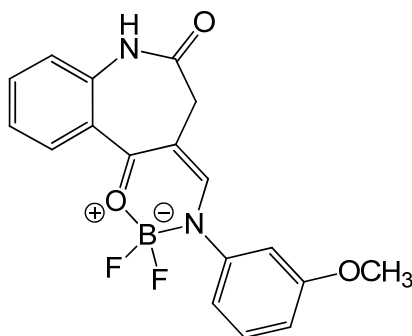
{(4Z)-4-[[3,5-Dichlor(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-difluorobor (**22m**)



Nach AAV 1 aus (4EZ)-4-[(3,5-Dichloranilino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**54m**; 104 mg, 0.300 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (51  $\mu$ l, 0.30 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (0.190 ml, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 1.5 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 64 mg (54%) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 260-262 °C; IR (KBr): 3212  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3086  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2976  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1678  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.23 (s, 2H, azepin.  $\text{CH}_2$ ), 7.25 (dd, 1H,  $J = 8.2/1.0$  Hz, ArH), 7.33 (ddd, 1H,  $J = 8.0/7.3/1.1$  Hz, ArH), 7.66 (ddd, 1H,  $J = 8.2/7.3/1.6$  Hz, ArH), 7.72 (d, 2H,  $J = 1.8$  Hz, ArH), 7.75 (t, 1H,  $J = 1.8$  Hz, ArH), 7.88 (dd, 1H,  $J = 8.1/1.6$  Hz, ArH), 8.67 (s, 1H, CH), 10.54 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 33.8 (sek. C); 122.0, 122.2 (2C), 123.9, 127.5, 129.2, 133.8, 164.0 (tert. C); 103.8, 123.9, 134.5 (2C), 139.1, 143.7, 168.9, 171.7 (quart. C);  $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BCl}_2\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2$  (395.00); ber. C 51.69, H 2.81, N 7.09; gef. C 51.74, H 2.76, N 6.70; HPLC: 97.6% bei 254 nm, 95.7% bei 280 nm und 98.0% bei 380 nm,  $t_N = 4.99$  min,  $t_M = 1.09$  min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$ : 222 nm und 376 nm.

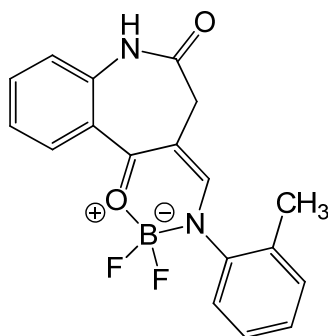
Difluoro-{(4*Z*)-4-[(3-methoxy(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden}-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-bor (**22n**)



Nach AAV 1 aus (4*EZ*)-4-[(3-Methoxyanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54n**; 93 mg, 0.30 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (51  $\mu$ l, 0.30 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (0.190 ml, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 1 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 50 mg (47%) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 219-221 °C; IR (KBr): 3214  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3121  $\text{cm}^{-1}$  und 3075  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2981  $\text{cm}^{-1}$ , 2937  $\text{cm}^{-1}$  und 2911  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1683  $\text{cm}^{-1}$  (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.23 (s, 2H, azepin. CH<sub>2</sub>), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.02-7.04 (m, 1H, ArH), 7.15-7.17 (m, 2H, ArH), 7.25 (dd, 1H, *J* = 8.2/1.0 Hz, ArH), 7.33 (ddd, 1H, *J* = 8.0/7.3/1.1 Hz, ArH), 7.41-7.44 (m, 1H, ArH), 7.64 (ddd, 1H, *J* = 8.2/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.87 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.6 Hz, ArH), 8.59 (s, 1H, CH), 10.51 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.4 (OCH<sub>3</sub>); 33.7 (sek. C); 109.0, 113.7, 115.5, 122.0, 123.8, 129.1, 130.1, 133.4, 163.0 (tert. C); 103.4, 124.2, 138.8, 142.9, 159.8, 167.3, 171.8 (quart. C); C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (356.13); ber. C 60.71, H 4.25, N 7.87; gef. C 60.81, H 4.26, N 7.61; HPLC: 97.2% bei 254 nm, 96.6% bei 280 nm und 97.2% bei 380 nm, *t*<sub>N</sub> = 6.23 min, *t*<sub>M</sub> = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 40:60),  $\lambda_{\text{max}}$ : 223 nm und 373 nm.

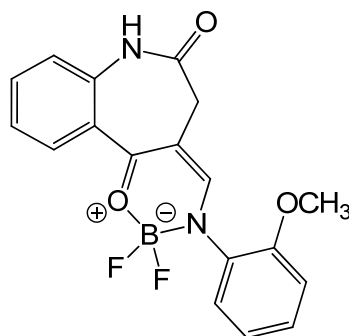
Difluoro-{(4*Z*)-4-[(2-methyl(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-bor (**22r**)



Nach AAV 1 aus (4*Z*)-4-(2-Toluidinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54r**; 88 mg, 0.30 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (51  $\mu$ l, 0.30 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (0.190 ml, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 4.5 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 55 mg (54%) eines weiß-gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 244-247 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3224  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3136  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2971  $\text{cm}^{-1}$  und 2921  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1683  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.19 (s, 2H, azepin. CH<sub>2</sub>), 7.25 (dd, 1H,  $J$  = 8.2/1.0 Hz, ArH), 7.27-7.28 (m, 1H, ArH), 7.31-7.34 (m, 2H, ArH), 7.37 (ddd, 1H,  $J$  = 7.5/7.4/1.5 Hz, ArH), 7.40-7.41 (m, 1H, ArH), 7.64 (ddd, 1H,  $J$  = 8.2/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.88 (dd, 1H,  $J$  = 8.0/1.6 Hz, ArH), 8.44 (s, 1H, CH), 10.50 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 17.2 (prim. C); 33.5 (sek. C); 121.9, 123.8, 126.0, 126.4, 128.4, 129.0, 131.0, 133.3, 165.6 (tert. C); 102.6, 124.4, 132.8, 138.7, 140.8, 167.4, 171.8 (quart. C); C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (340.13); ber. C 63.56, H 4.44, N 8.24; gef. C 63.24, H 4.44, N 7.90; HPLC: 98.5% bei 254 nm, 96.5% bei 280 nm und 98.0% bei 380 nm,  $t_N$  = 1.90 min,  $t_M$  = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$ : 356 nm.

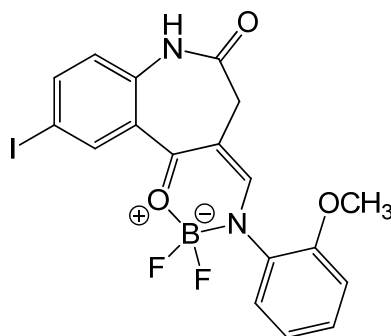
Difluoro-{(4*Z*)-4-[[2-methoxy(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-bor (**22s**)



Nach AAV 1 aus (4*Z*)-4-[(2-Methoxyanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54s**; 93 mg, 0.30 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (51  $\mu$ l, 0.30 mmol) und Bor-trifluorid-Etherat (0.190 ml, 1.50 mmol). Reaktionsdauer: 4.5 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 50 mg (47%) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 255-258 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3214  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3050  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2960  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1680  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.18 (s, 2H, azepin.  $\text{CH}_2$ ), 3.81 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.07 (ddd, 1H,  $J$  = 7.7/7.7/1.2 Hz, ArH), 7.25 (dd, 1H,  $J$  = 8.2/1.0 Hz, ArH) überlagert mit 7.26 (dd, 1H,  $J$  = 8.5/1.2 Hz, ArH), 7.33 (ddd, 1H,  $J$  = 8.0/7.3/1.1 Hz, ArH), 7.38-7.39 (m, 1H, ArH), 7.42 (ddd, 1H,  $J$  = 8.3/7.5/1.7 Hz, ArH), 7.64 (ddd, 1H,  $J$  = 8.2/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.87 (dd, 1H,  $J$  = 8.0/1.6 Hz, ArH), 8.45 (s, 1H, CH), 10.50 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 56.1 ( $\text{OCH}_3$ ), 33.5 (sek. C); 112.9, 120.3, 122.0, 123.9, 125.9, 129.1, 129.5, 133.3, 166.2 (tert. C); 102.5, 124.5, 130.0, 138.6, 152.7, 167.2, 171.8 (quart. C);  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_3$  (356.13); ber. C 60.71, H 4.25, N 7.87; gef. C 60.97, H 4.32, N 7.71; HPLC: 99.3% bei 254 nm, 98.8% bei 280 nm und 99.3% bei 380 nm,  $t_N$  = 2.48 min,  $t_M$  = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 45:55),  $\lambda_{\text{max}}$ : 365 nm.

Difluoro-{(4*Z*)-4-[(2-methoxy(phenylamino- $\kappa$ M)]methyliden)-7-iod-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-bor (**22u**)

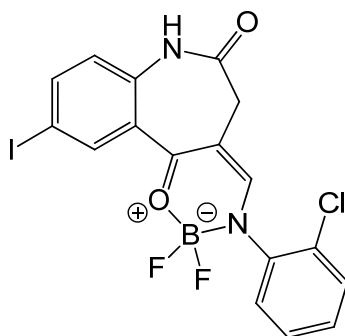


Nach AAV 1 aus (4*Z*)-7-iod-4-[(2-Methoxyanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54u**; 174 mg, 0.400 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (68  $\mu$ l, 0.40 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (0.253 ml, 2.00 mmol). Reaktionsdauer: 4 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 84 mg (44%) gelbe Kristalle erhalten.

Schmp.: 274-276 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3200  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3114  $\text{cm}^{-1}$  und 3057  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2943  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1686  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.20 (s, 2H, azepin.  $\text{CH}_2$ ), 3.80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.05 (d, 1H,  $J$  = 8.6 Hz, ArH) überlagert mit 7.07 (ddd, 1H,  $J$  = 7.8/7.7/1.1 Hz, ArH), 7.26 (dd, 1H,  $J$  = 8.3/1.1, ArH), 7.37-7.39 (m, 1H ArH), 7.43 (ddd, 1H,  $J$  = 8.3/7.6/1.6 Hz, ArH), 7.95 (dd, 1H,  $J$  = 8.6/2.1 Hz, ArH), 8.07 (d, 1H,  $J$  = 2.1 Hz, ArH), 8.48 (s, 1H, CH), 10.58 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 56.1 ( $\text{OCH}_3$ ); 33.3 (sek. C); 112.9, 120.4, 124.1, 125.9, 129.6, 136.7, 141.3, 165.4 (tert. C); 87.6, 102.8, 126.3, 129.8, 138.3, 152.7, 166.6, 171.6 (quart. C);  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BF}_2\text{IN}_2\text{O}_3$  (482.03); MS (EI):  $m/z$  (%) = 482  $[\text{M}]^+$  (100), 481  $[\text{M}]^+$  (23); HRMS (EI):  $m/z$   $[\text{M}]^+$  ber. 481.01465; gef. 481.01358; HPLC: 98.3% bei 254 nm, 95.1% bei 280 nm und 98.5% bei 380 nm,  $t_N$  = 3.50 min,  $t_M$  = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$ : 235 nm, 247 nm und 366 nm.



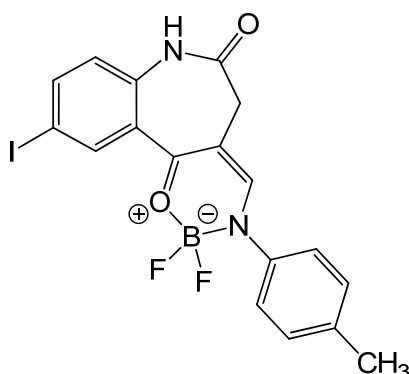
{(4Z)-4-[(2-Chlor(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden)-7-iod-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-difluorobor (**22v**)



Nach AAV 1 aus (4Z)-4-[(2-Chloranilino)methyliden]-7-iod-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**54v**; 176 mg, 0.400 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (68  $\mu$ l, 0.40 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (0.253 ml, 2.00 mmol). Reaktionsdauer: 3 h. Nach Umkristallisation aus Toluol und anschließender Umkristallisation aus Dichlormethan werden 29 mg (15%) gelbe Kristalle erhalten.

Schmp.: 266-269 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3214  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3071  $\text{cm}^{-1}$  und 3057  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2957  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1686  $\text{cm}^{-1}$  (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.23 (s, 2H, azepin. CH<sub>2</sub>), 7.06 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 7.50-7.55 (m, 3H, ArH), 7.70-7.72 (m, 1H, ArH), 7.97 (dd, 1H, *J* = 8.6/2.1 Hz), 8.09 (d, 1H *J* = 2.1 Hz, ArH), 8.60 (s, 1H, CH), 10.61 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 33.3 (sek. C); 124.1, 127.6, 127.9, 130.1, 130.3, 136.8, 141.7, 166.9 (tert. C); 87.7, 103.0, 126.1, 128.7, 138.5, 138.5, 166.9, 171.5 (quart. C); C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>BClF<sub>2</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (486.45); ber. C 41.98, H 2.28, N 5.76; gef. C 42.00, H 2.24, N 5.42; HPLC: 98.2% bei 254 nm, 96.5% bei 280 nm und 97.9% bei 380 nm, *t*<sub>N</sub> = 3.70 min, *t*<sub>M</sub> = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$ : 234 nm, 248 nm und 355 nm.

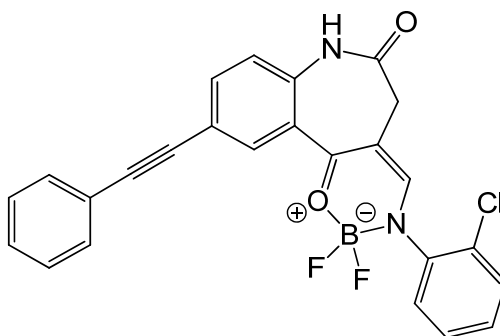
Difluoro-{(4*Z*)-4-{[4-methyl(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden}-7-iod-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-bor (22w)



Nach AAV 1 aus (4*EZ*)-7-Iod-4-(4-toluidinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54w**; 84 mg, 0.20 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (34  $\mu$ l, 0.20 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (0.127 ml, 1.00 mmol). Reaktionsdauer: 7 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 24 mg (26%) gelbe Kristalle erhalten.

Schmp.: 253-256 °C; IR (KBr): 3188  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3061  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2948  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1681  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.23 (s, 2H, azepin. CH<sub>2</sub>), 7.04 (d, 1H,  $J$  = 8.6 Hz, ArH), 7.32-7.34 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.46-7.47 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.94 (dd, 1H,  $J$  = 8.6/2.1 Hz, ArH), 8.07 (d, 1H,  $J$  = 2.1 Hz, ArH), 8.56 (s, 1H, CH), 10.58 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 20.6 (prim. C); 33.7 (sek. C); 123.1 (2C), 124.2, 129.9 (2C), 136.7, 141.4, 162.8 (tert. C); 87.7, 103.8, 126.3, 138.1, 138.5, 139.4, 165.1, 171.8 (quart. C); C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>BF<sub>2</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (466.03); MS (EI):  $m/z$  (%) = 466 [M]<sup>+</sup> (100), 465 [M]<sup>+</sup> (26); HRMS (EI):  $m/z$  [M-H]<sup>+</sup> ber. 464.01180; gef. 464.01036; HPLC: 97.4% bei 254 nm, 97.4% bei 280 nm und 98.0% bei 380 nm,  $t_N$  = 1.80 min,  $t_M$  = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 65:35),  $\lambda_{\text{max}}$ : 236 nm und 376 nm.

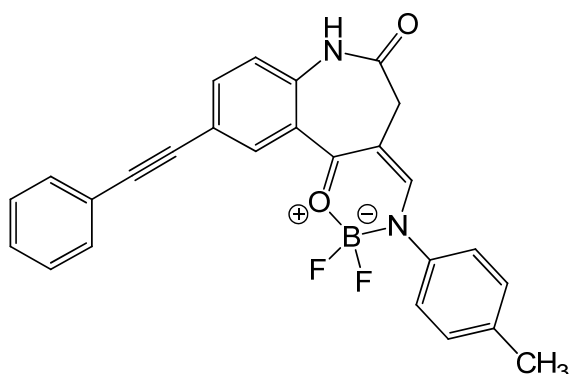
{(4Z)-4-[2-Chlor(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden}-7-(phenylethynyl)-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-difluorobor (22x)



Nach AAV 1 aus (4Z)-4-[(2-Chloranilino)methyliden]-7-(phenylethynyl)-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**54x**; 29 mg, 0.070 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (12  $\mu$ l, 0.070 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (44  $\mu$ l, 0.35 mmol). Reaktionsdauer 23 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 13 mg (40%) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 247-250 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3185  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3045  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2957  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1677  $\text{cm}^{-1}$  (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.27 (s, 2H, azepin. CH<sub>2</sub>), 7.30 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.43-7.46 (m, 4H, ArH), 7.51-7.56 (m, 3H, ArH), 7.62-7.63 (m, 1H, ArH), 7.71-7.73 (m, 1H, ArH), 7.82 (dd, 1H, *J* = 8.5/2.0 Hz, ArH), 8.00 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 8.62 (s, 1H, CH), 10.75 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 33.4 (sek. C); 122.6, 127.5, 127.9, 128.7 (2C), 128.9, 130.1, 130.3, 131.4 (2C), 132.0, 135.7, 166.9 (tert. C); 87.7, 89.7, 102.8, 117.5, 121.9, 124.3, 131.2, 138.5, 138.8, 167.4, 171.4 (quart. C); C<sub>25</sub>H<sub>16</sub>BClF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (460.67); ber. C 65.18, H 3.50, N 6.08; gef. C 65.24, H 3.38, N 5.77; HPLC: 98.1% bei 254 nm, 99.0% bei 280 nm und 97.2% bei 380 nm, *t*<sub>N</sub> = 3.67 min, *t*<sub>M</sub> = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$ : 280 nm, 298 nm und 354 nm.

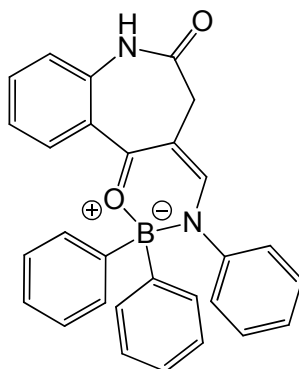
Difluoro-{(4*Z*)-4-{[4-methyl(phenylamino- $\kappa$ N)]methyliden}-7-(phenylethynyl)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-bor (22y)



Nach AAV 1 aus (4*EZ*)-7-(Phenylethynyl)-4-(4-toluidinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54y**; 25 mg, 0.063 mmol), mit Ethyldiisopropylamin (11  $\mu$ l, 0.063 mmol) und Bortrifluorid-Etherat (40  $\mu$ l, 0.32 mmol). Reaktionsdauer: 2 h. Nach Umkristallisation aus Toluol werden 18 mg (65%) gelbe Kristalle erhalten.

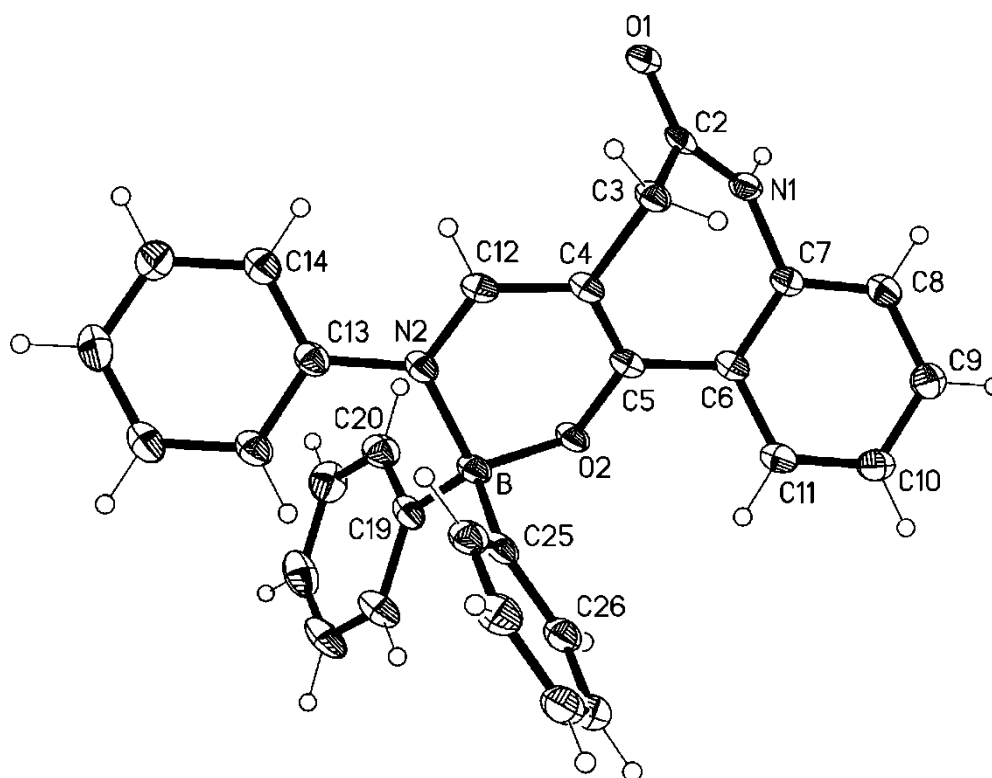
Schmp.: 268-271 °C; IR (KBr): 3198  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3100  $\text{cm}^{-1}$  und 3052  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2962  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1682  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.27 (s, 2H, azepin. CH<sub>2</sub>), 7.29 (d, 1H,  $J$  = 8.5 Hz, ArH), 7.33-7.34 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.43-7.46 (m, 3H, ArH), 7.48-7.49 (m, 2H, ArH, Teil eines AA'XX'-Systems), 7.60-7.64 (m, 2H, ArH), 7.79 (dd, 1H,  $J$  = 8.5/2.0 Hz, ArH), 7.97 (d, 1H,  $J$  = 2.0 Hz, ArH), 8.58 (s, 1H, CH), 10.71 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 20.5 (prim. C); 33.6 (sek. C); 122.5, 123.0 (2C), 128.7 (2C), 128.9, 129.8 (2C), 131.4 (2C), 131.9, 135.4, 162.7 (tert. C); 87.9, 89.6, 103.5, 117.4, 121.9, 124.4, 137.9, 138.7, 139.3, 165.5, 171.6 (quart. C); C<sub>26</sub>H<sub>19</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (440.25); MS (EI):  $m/z$  (%) = 440 [M]<sup>+</sup> (100), 439 [M]<sup>+</sup> (30); HRMS (EI):  $m/z$  [M-H]<sup>+</sup> ber. 438.14645; gef. 438.14563; HPLC: 99.0% bei 254 nm, 99.0% bei 280 nm und 98.7% bei 380 nm,  $t_N$  = 3.936 min,  $t_M$  = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 65:35),  $\lambda_{\text{max}}$ : 297 nm und 368 nm.

{(4*Z*)-4-[(Phenylamino- $\kappa$ N)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5-</sup>}-diphenylbor (23a)



Nach AAV 2 aus (4*EZ*)-4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54a**; 70 mg, 0.25 mmol) und Triphenylboran (**63**; 91 mg, 0.38 mmol). Reaktionsdauer: 18 h. Eine zweimalige Umkristallisation aus Aceton ergibt 35 mg (32%) eines orangefarbenen Pulvers.

Schmp.: 215-217 °C; IR (KBr): 3200 cm<sup>-1</sup> (NH), 3065 cm<sup>-1</sup> und 3005 cm<sup>-1</sup> (CH aromatisch), 2968 cm<sup>-1</sup> und 2908 cm<sup>-1</sup> (CH aliphatisch), 1677 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.07 (s, 2H, azepin. CH<sub>2</sub>), 7.09-7.12 (m, 2H, ArH), 7.15-7.22 (m, 11H, ArH), 7.34-7.36 (m, 4H, ArH), 7.54 (ddd, 1H, *J* = 8.1/7.3/1.5 Hz, ArH), 7.73 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.5 Hz, ArH), 8.46 (s, 1H, CH), 10.41 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 33.5 (sek. C); 121.6, 123.5, 123.9 (2C), 126.0 (2C), 126.6 (4C), 126.9, 128.4 (2C), 129.8, 132.8, 133.3 (4C), 161.5 (tert. C); 104.8, 125.0, 138.4, 144.8, 147.1 (2C), 168.4, 171.9 (quart. C); C<sub>29</sub>H<sub>23</sub>BN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (442.32); ber. C 78.75, H 5.24, N 6.33; gef. C 78.41, H 5.18, N 6.19; HPLC: 95.5% bei 254 nm, 96.5% bei 280 nm und 94.4% bei 380 nm, *t*<sub>N</sub> = 5.09 min, *t*<sub>M</sub> = 1.12 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$ : 229 nm.



**Abbildung 8-3:** Röntgenkristallstruktur von **23a**<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Die kristallographische Nummerierung entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

**Tabelle 8-7:** Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	$C_{30}H_{25}BCl_2N_2O_2$
$M_r$	527.23
Temperatur	100(2) K
Wellenlänge	1.54184 Å
Kristallsystem	Monoclinic
Raumgruppe	$P2_1/c$
Gitterkonstanten	$a = 17.2731(7)$ Å $\alpha = 90^\circ$ $b = 12.2211(4)$ Å $\beta = 100.975(5)^\circ$ $c = 12.5302(5)$ Å $\gamma = 90^\circ$
Volumen	$2596.71(17)$ Å <sup>3</sup>
Z	4
Dichte (berechnet)	$1.349$ Mg/m <sup>3</sup>
Absorptionskoeffizient	$2.494$ mm <sup>-1</sup>
$F(000)$	1096
Kristallgröße	$0.25 \times 0.03 \times 0.015$ mm <sup>3</sup>

Θ-Bereich für die Datensammlung	4.46 bis 76.01°
Limitierende Indices	-21≤h≤21, -15≤k≤15, -14≤l≤15
Zahl der Reflexe	45610
Unabhängige Reflexe	5390 [R(int) = 0.0729]
Vollständigkeit bis Θ = 75.00°	99.9%
Absorptionskorrektur	Semi-empirical from equivalents
Max. und Min. Transmission	1.00000 and 0.74709
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Daten/Einschränkungen/Parameter	5390 / 0 / 338
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.061
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0372, wR2 = 0.0973
R indices (alle Daten)	R1 = 0.0505, wR2 = 0.1017
Größte Differenzpeaks	0.359 und -0.514 e.Å <sup>-3</sup>

**Tabelle 8-8:** Atomkoordinaten (x 10<sup>4</sup>) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter (Å<sup>2</sup> x 10<sup>3</sup>)<sup>a,b,c</sup>

	x	y	z	U(eq)
N(1)	9520.6(8)	679.1(10)	3765.9(11)	19.6(3)
C(2)	8879.9(9)	398.6(11)	4177.5(13)	19.3(3)
C(3)	8094.7(9)	785.8(11)	3534.5(13)	20.6(3)
C(4)	8036.1(9)	2011.4(11)	3676.3(13)	19.4(3)
C(5)	8530.9(9)	2708.3(11)	3261.1(13)	18.8(3)
C(6)	9111.8(9)	2324.0(11)	2627.6(13)	19.5(3)
C(7)	9545.2(9)	1341.0(12)	2845.7(12)	19.2(3)
C(8)	10073.2(9)	1029.4(12)	2190.0(13)	23.1(3)
C(9)	10171.8(10)	1664.2(13)	1315.0(14)	26.6(3)
C(10)	9751.7(10)	2639.5(13)	1096.6(14)	26.6(3)
C(11)	9233.8(9)	2961.8(12)	1745.7(14)	23.1(3)
C(12)	7520.3(9)	2446.0(11)	4316.3(13)	19.3(3)
C(13)	6893.9(9)	3876.6(12)	5118.1(13)	20.8(3)
C(14)	6846.1(9)	3313.5(13)	6065.5(14)	23.9(3)
C(15)	6344.5(10)	3686.2(14)	6733.9(15)	28.3(4)
C(16)	5900.1(10)	4626.5(14)	6472.2(15)	29.5(4)

**Tabelle 8-8:** Atomkoordinaten ( $\times 10^4$ ) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ )<sup>a,b,c</sup> (Fortsetzung)

	x	y	z	U(eq)
C(17)	5959.5(10)	5194.5(13)	5532.8(15)	27.3(4)
C(18)	6447.9(10)	4830.5(12)	4854.5(14)	24.2(3)
C(19)	8062.9(9)	5421.7(12)	4344.3(14)	21.3(3)
C(20)	8527.0(10)	5317.1(13)	5379.9(15)	26.6(4)
C(21)	8783.3(11)	6219.2(14)	6030.1(15)	32.3(4)
C(22)	8574.6(11)	7267.3(14)	5640.7(17)	34.1(4)
C(23)	8129.0(11)	7395.7(13)	4613.0(18)	33.5(4)
C(24)	7871.6(10)	6484.6(13)	3974.5(15)	27.7(4)
C(25)	7174.0(9)	4523.7(11)	2493.4(13)	20.7(3)
C(26)	7446.1(10)	5090.3(12)	1660.4(14)	24.0(3)
C(27)	6970.9(11)	5276.6(13)	653.3(15)	27.4(4)
C(28)	6206.3(11)	4872.9(13)	425.1(14)	28.1(4)
C(29)	5923.5(10)	4299.6(13)	1225.9(15)	27.6(4)
C(30)	6395.8(10)	4138.5(12)	2242.1(14)	23.0(3)
B	7768.6(10)	4337.4(13)	3646.3(15)	19.7(3)
N(2)	7391.7(8)	3502.3(10)	4397.9(11)	19.4(3)
O(1)	8942.6(7)	-115.7(8)	5034.7(9)	22.4(2)
O(2)	8504.4(6)	3775.8(8)	3397.6(9)	20.1(2)
C(99)	4094.8(12)	2193.5(16)	2933.6(17)	36.7(4)
Cl(1)	4144.3(3)	2642.9(5)	1613.6(5)	51.1(2)
Cl(2)	5025.3(3)	2262.8(4)	3818.3(4)	36.9(1)

<sup>a</sup> Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup> Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

<sup>c</sup> U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten  $U_{ij}$  Tensors.

**Tabelle 8-9:** Bindungslängen [ $\text{\AA}$ ]<sup>a,b</sup>

N(1)-C(2)	1.351(2)	C(5)-O(2)	1.3176(17)
N(1)-C(7)	1.416(2)	C(5)-C(6)	1.470(2)
C(2)-O(1)	1.2313(19)	C(6)-C(11)	1.401(2)
C(2)-C(3)	1.515(2)	C(6)-C(7)	1.414(2)
C(3)-C(4)	1.5139(19)	C(7)-C(8)	1.392(2)



Tabelle 8-9: Bindungslängen [Å]<sup>a,b</sup> (Fortsetzung)

C(4)-C(5)	1.377(2)	C(8)-C(9)	1.380(2)
C(4)-C(12)	1.411(2)	C(9)-C(10)	1.395(2)
C(10)-C(11)	1.376(2)	C(22)-C(23)	1.378(3)
C(12)-N(2)	1.3172(19)	C(23)-C(24)	1.394(2)
C(13)-C(14)	1.388(2)	C(25)-C(30)	1.402(2)
C(13)-C(18)	1.402(2)	C(25)-C(26)	1.406(2)
C(13)-N(2)	1.435(2)	C(25)-B	1.621(2)
C(14)-C(15)	1.391(2)	C(26)-C(27)	1.387(2)
C(15)-C(16)	1.386(2)	C(27)-C(28)	1.388(3)
C(16)-C(17)	1.387(3)	C(28)-C(29)	1.387(3)
C(17)-C(18)	1.380(2)	C(29)-C(30)	1.389(2)
C(19)-C(20)	1.395(2)	B-O(2)	1.528(2)
C(19)-C(24)	1.397(2)	B-N(2)	1.608(2)
C(19)-B	1.616(2)	C(99)-Cl(1)	1.760(2)
C(20)-C(21)	1.392(2)	C(99)-Cl(2)	1.772(2)
C(21)-C(22)	1.393(3)		

<sup>a</sup> Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup> Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 8-10: Bindungswinkel [°]<sup>a,b</sup>

C(2)-N(1)-C(7)	127.56(13)	C(8)-C(7)-N(1)	116.69(13)
O(1)-C(2)-N(1)	121.33(14)	C(6)-C(7)-N(1)	123.08(14)
O(1)-C(2)-C(3)	122.98(14)	C(9)-C(8)-C(7)	120.61(14)
N(1)-C(2)-C(3)	115.66(13)	C(8)-C(9)-C(10)	119.85(16)
C(4)-C(3)-C(2)	108.64(12)	C(11)-C(10)-C(9)	120.06(15)
C(5)-C(4)-C(12)	119.10(13)	C(10)-C(11)-C(6)	121.29(14)
C(5)-C(4)-C(3)	120.50(14)	N(2)-C(12)-C(4)	123.16(14)
C(12)-C(4)-C(3)	120.17(13)	C(14)-C(13)-C(18)	119.63(15)
O(2)-C(5)-C(4)	121.61(14)	C(14)-C(13)-N(2)	121.35(13)
O(2)-C(5)-C(6)	115.50(13)	C(18)-C(13)-N(2)	119.03(14)
C(4)-C(5)-C(6)	122.89(13)	C(13)-C(14)-C(15)	119.85(15)
C(11)-C(6)-C(7)	118.14(14)	C(16)-C(15)-C(14)	120.61(16)
C(11)-C(6)-C(5)	117.96(13)	C(15)-C(16)-C(17)	119.25(16)

Tabelle 8-10: Bindungswinkel [ $^{\circ}$ ]<sup>a,b</sup> (Fortsetzung)

C(7)-C(6)-C(5)	123.89(14)	C(18)-C(17)-C(16)	120.92(15)
C(8)-C(7)-C(6)	120.03(14)	C(17)-C(18)-C(13)	119.73(16)
C(20)-C(19)-C(24)	116.82(15)	C(28)-C(29)-C(30)	120.56(16)
C(20)-C(19)-B	119.61(13)	C(29)-C(30)-C(25)	121.93(16)
C(24)-C(19)-B	123.56(15)	O(2)-B-N(2)	106.24(11)
C(21)-C(20)-C(19)	122.28(16)	O(2)-B-C(19)	106.90(12)
C(20)-C(21)-C(22)	119.40(18)	N(2)-B-C(19)	108.92(13)
C(23)-C(22)-C(21)	119.56(16)	O(2)-B-C(25)	106.97(13)
C(22)-C(23)-C(24)	120.39(16)	N(2)-B-C(25)	110.64(12)
C(23)-C(24)-C(19)	121.53(17)	C(19)-B-C(25)	116.60(12)
C(30)-C(25)-C(26)	116.12(15)	C(12)-N(2)-C(13)	119.43(13)
C(30)-C(25)-B	124.79(14)	C(12)-N(2)-B	118.92(13)
C(26)-C(25)-B	119.08(14)	C(13)-N(2)-B	121.60(12)
C(27)-C(26)-C(25)	122.19(15)	C(5)-O(2)-B	121.46(12)
C(26)-C(27)-C(28)	120.28(16)	Cl(1)-C(99)-Cl(2)	111.86(11)
C(29)-C(28)-C(27)	118.89(16)		

<sup>a</sup> Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup> Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 8-11: Torsionswinkel [ $^{\circ}$ ]<sup>a,b</sup>

C(7)-N(1)-C(2)-O(1)	-174.34(14)	C(24)-C(19)-C(20)-C(21)	0.8(3)
C(7)-N(1)-C(2)-C(3)	4.0(2)	B-C(19)-C(20)-C(21)	-178.49(16)
O(1)-C(2)-C(3)-C(4)	106.47(16)	C(19)-C(20)-C(21)-C(22)	-0.2(3)
N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-71.79(17)	C(20)-C(21)-C(22)-C(23)	-1.0(3)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	66.52(19)	C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	1.5(3)
C(2)-C(3)-C(4)-C(12)	-107.98(16)	C(22)-C(23)-C(24)-C(19)	-0.9(3)
C(12)-C(4)-C(5)-O(2)	-3.7(2)	C(20)-C(19)-C(24)-C(23)	-0.3(3)
C(3)-C(4)-C(5)-O(2)	-178.28(14)	B-C(19)-C(24)-C(23)	178.97(16)
C(12)-C(4)-C(5)-C(6)	177.20(14)	C(30)-C(25)-C(26)-C(27)	1.1(2)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	2.6(2)	B-C(25)-C(26)-C(27)	179.81(14)
O(2)-C(5)-C(6)-C(11)	-37.0(2)	C(25)-C(26)-C(27)-C(28)	-1.9(2)
C(4)-C(5)-C(6)-C(11)	142.09(16)	C(26)-C(27)-C(28)-C(29)	1.1(2)
O(2)-C(5)-C(6)-C(7)	143.98(15)	C(27)-C(28)-C(29)-C(30)	0.4(2)

Tabelle 8-11: Torsionswinkel [ $^{\circ}$ ]<sup>a,b</sup> (Fortsetzung)

C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	-36.9(2)	C(28)-C(29)-C(30)-C(25)	-1.3(2)
C(11)-C(6)-C(7)-C(8)	-0.2(2)	C(26)-C(25)-C(30)-C(29)	0.5(2)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	178.77(14)	B-C(25)-C(30)-C(29)	-178.13(14)
C(11)-C(6)-C(7)-N(1)	174.52(14)	C(20)-C(19)-B-O(2)	-65.27(18)
C(5)-C(6)-C(7)-N(1)	-6.5(2)	C(24)-C(19)-B-O(2)	115.45(16)
C(2)-N(1)-C(7)-C(8)	-142.05(15)	C(20)-C(19)-B-N(2)	49.12(19)
C(2)-N(1)-C(7)-C(6)	43.1(2)	C(24)-C(19)-B-N(2)	-130.16(16)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-0.9(2)	C(20)-C(19)-B-C(25)	175.17(14)
N(1)-C(7)-C(8)-C(9)	-175.95(15)	C(24)-C(19)-B-C(25)	-4.1(2)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	1.4(3)	C(30)-C(25)-B-O(2)	123.71(15)
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	-0.7(3)	C(26)-C(25)-B-O(2)	-54.90(16)
C(9)-C(10)-C(11)-C(6)	-0.4(3)	C(30)-C(25)-B-N(2)	8.4(2)
C(7)-C(6)-C(11)-C(10)	0.9(2)	C(26)-C(25)-B-N(2)	-170.20(12)
C(5)-C(6)-C(11)-C(10)	-178.17(15)	C(30)-C(25)-B-C(19)	-116.78(16)
C(5)-C(4)-C(12)-N(2)	11.4(2)	C(26)-C(25)-B-C(19)	64.62(19)
C(3)-C(4)-C(12)-N(2)	-174.07(14)	C(4)-C(12)-N(2)-C(13)	-176.30(14)
C(18)-C(13)-C(14)-C(15)	1.3(2)	C(4)-C(12)-N(2)-B	6.3(2)
N(2)-C(13)-C(14)-C(15)	-178.62(14)	C(14)-C(13)-N(2)-C(12)	31.1(2)
C(13)-C(14)-C(15)-C(16)	-1.1(3)	C(18)-C(13)-N(2)-C(12)	-148.83(15)
C(14)-C(15)-C(16)-C(17)	0.1(3)	C(14)-C(13)-N(2)-B	-151.55(15)
C(15)-C(16)-C(17)-C(18)	0.6(3)	C(18)-C(13)-N(2)-B	28.5(2)
C(16)-C(17)-C(18)-C(13)	-0.3(3)	O(2)-B-N(2)-C(12)	-26.76(18)
C(14)-C(13)-C(18)-C(17)	-0.7(2)	C(19)-B-N(2)-C(12)	-141.59(14)
N(2)-C(13)-C(18)-C(17)	179.28(14)	C(25)-B-N(2)-C(12)	88.99(16)
O(2)-B-N(2)-C(13)	155.90(13)	C(6)-C(5)-O(2)-B	157.03(13)
C(19)-B-N(2)-C(13)	41.07(18)	N(2)-B-O(2)-C(5)	35.05(18)
C(25)-B-N(2)-C(13)	-88.35(16)	C(19)-B-O(2)-C(5)	151.25(13)
C(4)-C(5)-O(2)-B	-22.1(2)	C(25)-B-O(2)-C(5)	-83.16(16)

<sup>a</sup> Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup> Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 8-12: Wasserstoffbrückenbindungen [ $\text{\AA}$  und  $^\circ$ ]<sup>a,b</sup>

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(1)-H(01)...O(1)#1	0.87(2)	2.01(2)	2.8741(18)	171.8(18)
C(10)-H(10)...N(1)#2	0.95	2.62	3.531(2)	161.3
C(11)-H(11)...O(1)#2	0.95	2.66	3.3716(19)	131.8
C(29)-H(29)...Cl(1)	0.95	2.92	3.7879(18)	152.2
C(17)-H(17)...Cl(2)#3	0.95	2.88	3.7064(17)	145.9

Benutzte Symmetrietransformationen für die Generierung äquivalenter Atome:

#1  $-x+2, -y, -z+1$

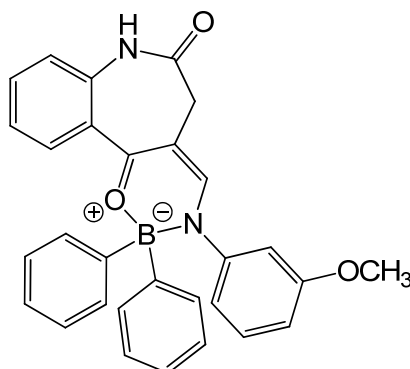
#2  $x, -y+1/2, z-1/2$

#3  $-x+1, -y+1, -z+1$

<sup>a</sup> Die angegebene kristallographische Nummerierung der Atome entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur.

<sup>b</sup> Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

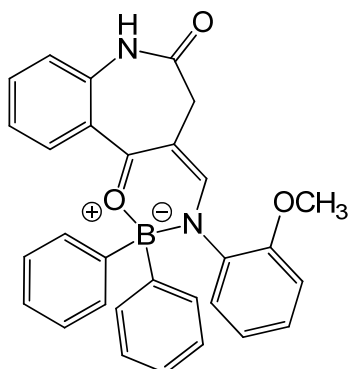
{(4*Z*)-4-[3-Methoxy(phenylamino- $\kappa$ N)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-diphenylbor (**23b**)



Nach AAV 2 aus (4*EZ*)-4-[(3-Methoxyanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54b**; 154 mg, 0.500 mmol) und Triphenylboran (**63**; 182 mg, 0.750 mmol). Reaktionsdauer: 21 h. Nach Umkristallisation aus Aceton werden 33 mg (14%) eines orangefarbenen Pulvers erhalten.

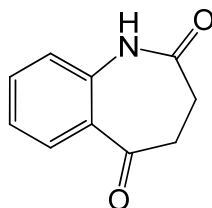
Schmp.: 199-200 °C; IR (KBr): 3202 cm<sup>-1</sup> (NH), 3065 cm<sup>-1</sup> und 3003 cm<sup>-1</sup> (CH aromatisch), 2965 cm<sup>-1</sup> und 2910 cm<sup>-1</sup> (CH aliphatisch), 1677 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.07 (s, 2H, azepin. CH<sub>2</sub>), 3.54 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.66 (dd, 1H, *J* = 2.3/2.2 Hz, ArH), 6.74 (ddd, 1H, *J* = 8.3/2.4/0.7, ArH), 6.79 (ddd, 1H, *J* = 8.0/2.1/0.7 Hz, ArH), 7.11-7.13 (m, 2H, ArH) überlagert mit 7.13 (dd, 1H, *J* = 8.2/8.0 Hz, ArH), 7.16-7.18 (m, 5H, ArH), 7.22 (ddd, 1H, *J* = 7.9/7.3/1.0 Hz, ArH), 7.34-7.36 (m, 4H, ArH), 7.55 (ddd, 1H, *J* = 8.1/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.75 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.6 Hz, ArH), 8.45 (s, 1H, CH), 10.40 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 54.9 (OCH<sub>3</sub>); 33.6 (sek. C); 109.9, 112.8, 116.2, 121.6, 123.5, 126.1 (2C), 126.7 (4C), 129.3, 129.8, 132.8, 133.2 (4C), 161.6 (tert. C); 104.8, 125.1, 138.5, 146.0, 147.3 (2C), 158.8, 168.6, 172.0 (quart. C); C<sub>30</sub>H<sub>25</sub>BN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (472.34); ber. C 76.28, H 5.33, N 5.93; gef. C 76.43, H 5.27, N 5.69; HPLC: 94.0% bei 254 nm, 94.9% bei 280 nm und 89.2% bei 380 nm, *t*<sub>N</sub> = 4.77 min, *t*<sub>M</sub> = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 60:40),  $\lambda_{\text{max}}$ : 230 nm.

{(4Z)-4-[2-Methoxy(phenylamino- $\kappa$ N)methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dionato- $\kappa$ O<sup>5</sup>}-diphenylbor (**23c**)



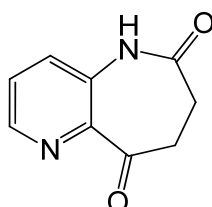
Nach AAV 2 aus (4Z)-4-[(2-Methoxyanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**54c**; 62 mg, 0.20 mmol) und Triphenylboran (**63**; 73 mg, 0.30 mmol). Reaktionsdauer: 10 h. Die zweimalige Umkristallisation aus Aceton ergibt 19 mg (20%) eines gelben Pulvers.

Schmp.: 234-237 °C; IR (KBr): 3215 cm<sup>-1</sup> (NH), 3065 cm<sup>-1</sup> und 3004 cm<sup>-1</sup> (CH aromatisch), 2957 cm<sup>-1</sup> und 2929 cm<sup>-1</sup> (CH aliphatisch), 1681 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 3.02 (s, 2H, azepin. CH<sub>2</sub>), 3.55 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.74 (ddd, 1H, *J* = 7.8/7.6/1.2 Hz, ArH), 6.95 (dd, 1H, *J* = 8.4/1.2 Hz, ArH), 7.02 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.7 Hz, ArH), 7.06-7.08 (m, 2H, ArH), 7.10-7.13 (m, 5H, ArH), 7.18 (dd, 1H, *J* = 8.3/0.9 Hz, ArH), 7.22 (ddd, 1H, *J* = 7.9/7.3/1.1 Hz, ArH), 7.30-7.31 (m, 4H, ArH), 7.55 (ddd, 1H, *J* = 8.1/7.3/1.6 Hz, ArH), 7.72 (dd, 1H, *J* = 7.9/1.6 Hz, ArH), 8.29 (s, 1H, CH), 10.39 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 56.2 (OCH<sub>3</sub>); 33.8 (sek. C); 113.0, 120.0, 122.0, 123.8, 126.1 (2C), 126.6, 126.7 (4C), 128.6, 130.1, 132.9, 133.3 (4C), 164.7 (tert. C); 104.3, 125.7, 133.8, 138.6, 147.5 (2C), 152.9, 168.0, 172.2 (quart. C); C<sub>30</sub>H<sub>25</sub>BN<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (472.34); ber. C 76.28, H 5.33, N 5.93; gef. C 75.65, H 5.33, N 5.82; MS (EI): *m/z* (%) = 472 [M]<sup>+</sup> (100), 471 [M]<sup>+</sup> (21); HRMS (EI): *m/z* [M-H]<sup>+</sup> ber. 470.19149; gef. 470.19058; HPLC: 96.8% bei 254 nm, 95.2% bei 280 nm und 97.7% bei 380 nm, *t*<sub>N</sub> = 4.14 min, *t*<sub>M</sub> = 1.09 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 65:35),  $\lambda_{\text{max}}$ : 230 nm und 396 nm.

3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**)

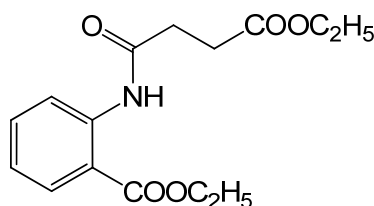
5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**28**; 3.7 g, 0.015 mol) wird mit Wasser (0.15 ml) in Dimethylsulfoxid (40 ml) unter Stickstoffbegasung bei 150 °C Ölbadtemperatur gerührt. Nach 1 h und 3 h wird abermals Wasser (0.15 ml) zugegeben. Nach insgesamt 4 h lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und gießt auf Wasser (300 ml). Das Gemisch wird 12 h im Kühlschrank aufbewahrt. Die gebildeten Kristalle werden abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Es werden 2.3 g (87%) farblose Kristalle erhalten.

Schmp.: 187-188 °C (Lit.<sup>79</sup>: 187 °C)

7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**24b**)

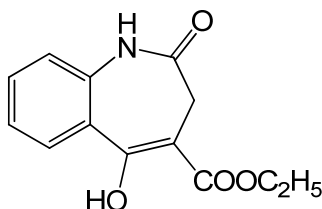
9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-8-carbonsäureethylester (**32**; 125 mg, 0.500 mmol) wird in einem Zweihalskolben in *N,N*-Dimethylformamid (10 ml) unter Stickstoffbegasung bei 150 °C Ölbadtemperatur gerührt. Alle 30 min werden zwei Tropfen Wasser hinzugegeben. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wird das Lösungsmittel im Vakuum evaporiert. Der verbleibende Rückstand wird ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.

Schmp.: 174-175 °C (Lit.<sup>77</sup>: 180 °C)

2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]benzoesäureethylester (**27**)

Eine Lösung von Bernsteinsäureethylesterchlorid (**26**; 22.5 g, 0.137 mol) in trockenem Toluol (17 ml) wird unter Rühren und Kühlen im Eisbad zu einem Gemisch aus Anthranilsäureethylester (**25**; 18.7 g, 0.113 mol) und Pyridin (13 ml) in trockenem Toluol (50 ml) getropft. Die entstandene Suspension wird 2 h zum Reflux erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die organische Phase nacheinander mit Wasser (17 ml), 10%iger Salzsäure (17 ml) und 5%iger Natriumcarbonat-Lösung (17 ml) extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach der Umkristallisation aus Ethanol 96% werden 24.7 g (74%) weiße Kristalle erhalten.

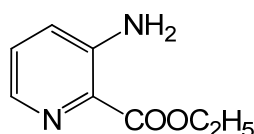
Schmp.: 60-61 °C (Lit.<sup>79</sup>: 60 °C)

5-Hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**28**)

Nach AAV 3 aus 2-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]benzoesäureethylester (**27**; 14.7 g, 0.0500 mol). Reaktionsdauer: 3 h. Es werden nach Methode A 9.8 g (79%) und nach Methode B 10.3 g (83%) farblose Kristalle erhalten.

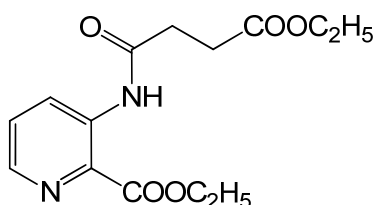
Schmp.: 208-210 °C (Lit.<sup>79</sup>: 210-213 °C)



3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (30)

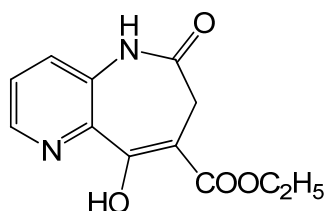
3-Aminopyridin-2-carbonsäure (**29**; 5.0 g, 0.036 mol) wird in trockenem Ethanol (70 ml) und konzentrierter Schwefelsäure (6 ml) zum Rückfluss für 90 h erhitzt. Nach Ende der Reaktion wird der Ansatz im Vakuum auf ca. 20 ml eingengt. Unter Eiskühlung wird der Ansatz vorsichtig mit 25%iger Ammoniak-Lösung alkalisiert und mit Ethylacetat (5 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Es werden 4.2 g (70%) farblose Kristalle erhalten.

Schmp.: 128-129 °C (Lit.<sup>77</sup>: 129 °C)

3-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylester (31)

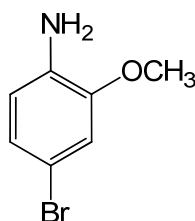
Zu 3-Aminopyridin-2-carbonsäureethylester (**30**; 3.2 g, 0.019 mol) in Pyridin (2.2 ml) und trockenem Toluol (25 ml) wird unter Rühren und Kühlen eine Lösung von Bernsteinsäureethylesterchlorid (3.9 g, 0.024 mol) in trockenem Toluol (6 ml) getropft. Anschließend wird bis zur vollständigen Umsetzung zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit Wasser (8.5 ml) versetzt, in einen Scheidetrichter überführt und die wässrige Phase abgetrennt. Die organische Phase wird zweimal mit 10%iger Salzsäure (10 ml), zweimal mit 5%iger Natriumcarbonat-Lösung (10 ml) und mit Wasser (10 ml) gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird im Vakuum zur Trockne eingengt. Es werden 4.3 g (77%) farblose Kristalle erhalten.

Schmp.: 69-70 °C (Lit.<sup>82</sup>: 68 °C)

9-Hydroxy-6-oxo-6,7-dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-8-carbonsäureethylester (32)

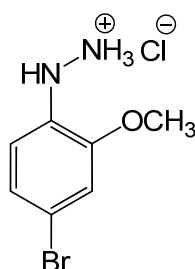
Nach AAV 3 aus 3-[(4-Ethoxy-1,4-dioxobutyl)amino]pyridin-2-carbonsäureethylester (31). Es werden nach Methode A (Reaktionsdauer 4.5 h) 480 mg (27%) und nach Methode B (Reaktionsdauer 3 h) 521 mg (74%) farblose Kristalle erhalten.

Schmp.: 216-218 °C (Lit.<sup>77</sup>: 220 °C)

4-Brom-2-methoxyanilin (38)

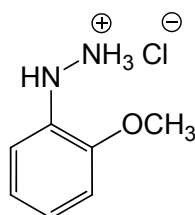
Eine Lösung von Brom (1.8 ml, 35 mmol) in Eisessig (23 ml) wird langsam unter Kühlung zu einer Lösung von 2-Methoxyanilin (40; 4.2 ml, 37 mmol) in Eisessig (20 ml) getropft. Ein während des Zutropfens entstandener Niederschlag wird abgesaugt, mit Eisessig gewaschen und in Wasser (50 ml) gelöst bzw. suspendiert. Unter Eiskühlung wird mit 10%iger Kaliumhydroxid-Lösung alkalisiert und der Ansatz über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Eine violette Kristallfraktion wird isoliert und verworfen, eine farblose Kristallfraktion wird abgesaugt und aus Petrolether umkristallisiert. Es werden 3.5 g (49%) farblose Kristalle erhalten.

Schmp.: 61-62 °C (Lit.<sup>86</sup>: 61 °C)

4-Brom-2-methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid (44)

4-Brom-2-methoxyanilin (**38**; 808 mg, 4.00 mmol) wird in konzentrierter Salzsäure (4 ml) suspendiert und unterhalb von 0 °C (in einer Eis-Natriumchlorid-Mischung 3:1) gerührt. Unter Beibehaltung einer Temperatur von unter 0 °C wird langsam eine Lösung von Natriumnitrit (276 mg, 4.00 mmol) in Wasser (3.5 ml) zugetropft. Es wird noch 30 min gerührt, wenn nötig filtriert und eine vorgekühlte Lösung von Zinn(II)chlorid-Dihydrat (2.7 g, 12 mmol) in konzentrierter Salzsäure (7 ml) unterhalb von 0 °C unter Rühren zugetropft. Der Ansatz wird über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Ein entstandener Niederschlag wird abfiltriert, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung und anschließend mit einem Gemisch aus Petrolether und *tert*-Butylmethylether (2:1) gewaschen und getrocknet. Der Niederschlag wird in Wasser (20 ml) suspendiert, unter Eiskühlung langsam mit konzentrierter Natriumhydroxid-Lösung alkalisiert und mit *tert*-Butylmethylether (4 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden unter Kühlung mit Chlorwasserstoffgas gesättigt. Ein entstandener Niederschlag wird aus einem Gemisch aus Ethylacetat und Ethanol 96% (2:1) umkristallisiert. Es werden 255 mg (25%) farblose Kristalle erhalten.

Schmp.: (Hydrochlorid) 179-180 °; (freie Base) 61-63 °C (Lit.<sup>173</sup>: 63 °C)

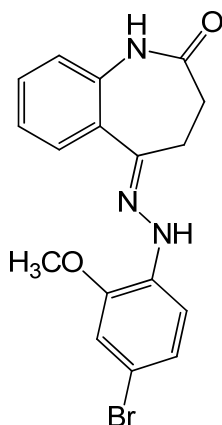
2-Methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid (46)

2-Methoxyanilin (**40**; 0.9 ml, 8.0 mmol) wird in konzentrierter Salzsäure (8 ml) suspendiert und unterhalb von 0 °C (in einer Eis-Natriumchlorid-Mischung 3:1) gerührt.

Unter Beibehaltung einer Temperatur von unter 0 °C wird langsam eine Lösung von Natriumnitrit (552 mg, 8.00 mmol) in Wasser (7 ml) zugetropft. Es wird noch 30 min gerührt, wenn nötig filtriert und unterhalb von 0 °C eine vorgekühlte Lösung von Zinn(II)chlorid-Dihydrat (5.4 g, 24 mmol) in konzentrierter Salzsäure (14 ml) unter Rühren zugetropft. Der Ansatz wird über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Ein entstandener Niederschlag wird abfiltriert, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung und anschließend mit einem Gemisch aus Petrolether und *tert*-Butylmethylether (2:1) gewaschen und getrocknet. Der Niederschlag wird in Wasser (20 ml) suspendiert, unter Eiskühlung langsam mit konzentrierter Natriumhydroxid-Lösung alkalisiert und mit *tert*-Butylmethylether (4 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden unter Kühlung mit Chlorwasserstoffgas gesättigt. Ein entstandener Niederschlag wird aus einem Gemisch aus Ethylacetat und Ethanol 96% (2:1) umkristallisiert. Es werden 307 mg (22%) farblose Kristalle erhalten.

Schmp.: (Hydrochlorid) 156-157 °C; (freie Base) 45-46 °C (Lit.<sup>90</sup>: 43-44 °C)

3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-5-[(4-brom-2-methoxyphenyl)hydrazon] (**47a**)

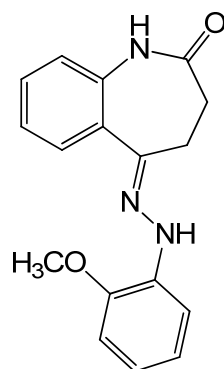


Nach AAV 4 wird 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**, 175 mg, 1.00 mmol) mit 4-Brom-2-methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid (**44**; 380 mg, 1.50 mmol) und Natriumacetat (123 mg, 1.50 mmol) innerhalb von 45 min umgesetzt. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% werden 228 mg (61%) orangefarbene Kristalle erhalten.

Schmp.: ab 219 °C Zersetzung; IR (KBr): 3378 cm<sup>-1</sup> und 3189 cm<sup>-1</sup> (NH), 3120 cm<sup>-1</sup> und 3072 cm<sup>-1</sup> (CH aromatisch), 2998 cm<sup>-1</sup>, 2970 cm<sup>-1</sup> und 2916 cm<sup>-1</sup> (CH aliphatisch), 1678 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.52 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz,

CH<sub>2</sub>, teilweise überlagert vom DMSO-Signal), 3.04 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz, CH<sub>2</sub>), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.01 (dd, 1H,  $J = 7.9/1.1$  Hz, ArH), 7.06 (dd, 1H,  $J = 8.5/2.1$  Hz, ArH), 7.14 (d, 1H,  $J = 2.1$  Hz, ArH), 7.17 (ddd, 1H,  $J = 7.6/7.5/1.2$  Hz, ArH), 7.28 (d, 1H,  $J = 8.5$  Hz, ArH), 7.34 (ddd, 1H,  $J = 7.9/7.5/1.6$  Hz, ArH), 7.65 (dd, 1H,  $J = 7.8/1.6$  Hz, ArH), 8.06 (s, 1H, NH), 9.77 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 56.0 (OCH<sub>3</sub>); 28.7, 30.6 (sek. C); 113.7 (2C), 121.8, 123.5, 124.2, 129.1, 129.5 (tert. C); 110.5, 130.5, 133.9, 137.1, 146.5, 146.8, 172.9 (quart. C); C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (374.23); ber. C 54.56, H 4.31, N 11.23; gef. C 54.53, H 4.20, N 10.82; MS (EI):  $m/z$  (%) = 373 [M]<sup>+</sup> (100), 375 [M]<sup>+</sup> (97); HRMS (EI):  $m/z$  [M]<sup>+</sup> ber. 373.04202; gef. 373.04152; HPLC: 98.3% bei 254 nm und 98.1% bei 280 nm,  $t_N = 3.10$  min,  $t_M = 1.02$  min (ACN/H<sub>2</sub>O; 60:40),  $\lambda_{\max}$ : 256 nm, 296 nm und 334 nm.

### 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion-5-[(2-methoxyphenyl)hydrazon] (47b)



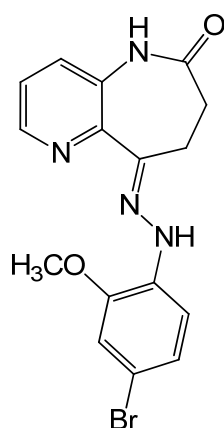
Nach AAV 4 wird 3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**; 175 mg, 1.00 mmol) mit 2-Methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid (**46**; 192 mg, 1.10 mmol) und Natriumacetat (90 mg, 1.1 mmol) innerhalb von 30 min umgesetzt. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% und anschließender Umkristallisation aus Isopropanol werden 45 mg (15%) orangefarbene Kristalle erhalten.

Schmp.: 208-210 °C; IR (KBr): 3364 cm<sup>-1</sup> und 3201 cm<sup>-1</sup> (NH), 2962 cm<sup>-1</sup> (CH aliphatisch), 1682 cm<sup>-1</sup> (C=O); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.54 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz, CH<sub>2</sub> an C3), 3.03 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz, CH<sub>2</sub> an C4), 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.82 (ddd, 1H,  $J = 7.7/7.7/1.6$  Hz, ArH an C4'), 6.89 (ddd, 1H,  $J = 7.6/7.6/1.1$  Hz, ArH an C5'), 6.98 (dd, 1H,  $J = 8.0/1.1$  Hz, ArH an C3'), 7.02 (dd, 1H,  $J = 8.0/0.9$  Hz, ArH an C1), 7.17 (ddd, 1H,  $J = 7.6/7.6/1.0$  Hz, ArH an C3), 7.32-7.36 (m, 2H, ArH an C2/C6'), 7.66 (dd, 1H,  $J = 7.8/1.5$  Hz, ArH an C4), 8.00 (s, 1H, Hydrazon-NH), 9.77 (s, 1H, Lactam-NH);

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.9 (OCH<sub>3</sub>); 28.9, 31.0 (sek. C); 110.9, 112.6, 119.9, 121.3, 122.1, 124.5, 129.3, 129.8 (tert. C); 131.0, 134.6, 137.4, 145.9 (2), 173.3 (quart. C); C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (295.34); ber. C 69.14, H 5.80, N 14.23; gef. C 69.02, H 5.82, N 14.07; HPLC: 98.7% bei 254 nm und 97.8% bei 280 nm,  $t_N$  = 2.43 min,  $t_M$  = 1.09 min (ACN/H<sub>2</sub>O; 50:50),  $\lambda_{\text{max}}$ : 290 nm und 330 nm.

7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion-9-[(4-brom-2-methoxyphenyl)hydrazon]

**(48a)**

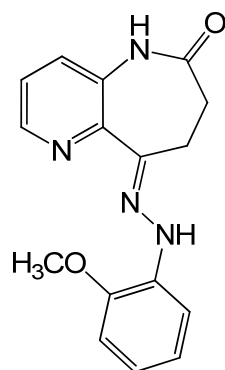


Nach AAV 4 wird 7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**24b**; 176 mg, 1.00 mmol) mit 4-Brom-2-methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid (**44**; 380 mg, 1.50 mmol) und Natriumacetat (123 mg, 1.50 mmol) innerhalb von 60 min umgesetzt. Nach der Umkristallisation aus Ethanol 96% werden 77 mg (21%) braune Kristalle erhalten.

Schmp.: ab 239 °C Zersetzung; IR (KBr): 3343 cm<sup>-1</sup> und 3200 cm<sup>-1</sup> (NH), 3115 cm<sup>-1</sup>, 3067 cm<sup>-1</sup>, 3033 cm<sup>-1</sup> und 3009 cm<sup>-1</sup> (CH aromatisch), 2963 cm<sup>-1</sup>, 2881 cm<sup>-1</sup> und 2851 cm<sup>-1</sup> (CH aliphatisch), 1679 cm<sup>-1</sup> (C=O);  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.56 (t, 2H,  $J$  = 6.5 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.10 (t, 2H,  $J$  = 6.5 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.06 (dd, 1H,  $J$  = 8.6/2.1 Hz, ArH), 7.15 (d, 1H,  $J$  = 2.1 Hz, ArH), 7.25 (d, 1H,  $J$  = 8.6 Hz, ArH), 7.38 (dd, 1H,  $J$  = 8.1/4.4 Hz, ArH), 7.41 (dd, 1H,  $J$  = 8.1/1.7 Hz, ArH), 8.21 (s, 1H, NH), 8.42 (dd, 1H,  $J$  = 4.4/1.7 Hz, ArH), 9.83 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 56.0 (OCH<sub>3</sub>); 28.8, 30.4 (sek. C); 113.7, 114.0, 123.5, 123.6, 129.4, 145.4 (tert. C); 110.9, 133.6, 134.3, 145.2, 146.5, 147.6, 172.8 (quart. C); C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (375.22); ber. C 51.22, H 4.03, N 14.93; gef. C 50.96, H 3.96, N 13.84; MS (EI):  $m/z$  (%) = 374 [M]<sup>+</sup> (100), 376 [M]<sup>+</sup> (86); HRMS (EI):  $m/z$  [M]<sup>+</sup> ber. 374.03729;

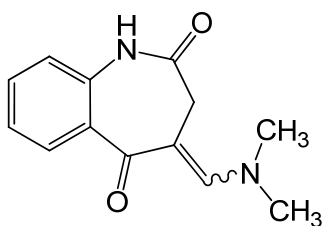
gef. 374.03589; HPLC: 99.8% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm,  $t_N$  = 3.05 min,  $t_M$  = 1.02 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 30:70),  $\lambda_{\max}$ : 249 nm und 331 nm.

7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion-9-[(2-methoxyphenyl)hydrazon] (**48b**)



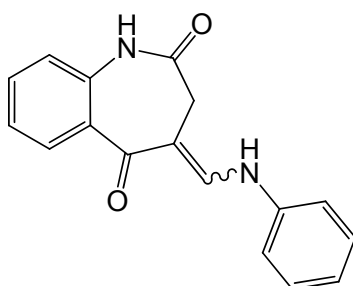
Nach AAV 4 wird 7,8-Dihydro-5H-pyrido[3,2-b]azepin-6,9-dion (**24b**; 176 mg, 1.00 mmol) mit 2-Methoxyphenylhydrazin-Hydrochlorid (**46**; 192 mg, 1.10 mmol) und Natriumacetat (90 mg, 1.1 mmol) innerhalb von 30 min umgesetzt. Nach der Umkristallisation aus Ethanol 96% wird der isolierte Niederschlag mittels präparativer HPLC (Acetonitril/Wasser; 20:80) gereinigt. Es werden 47 mg (19%) orange-braune Kristalle erhalten.

Schmp.: ab 190 °C Schwarzfärbung, 205-208 °C schwarze Schmelze; IR (KBr): 3340  $\text{cm}^{-1}$  und 3200  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 3117  $\text{cm}^{-1}$ , 3069  $\text{cm}^{-1}$  und 3035  $\text{cm}^{-1}$  (CH aromatisch), 2882  $\text{cm}^{-1}$  (CH aliphatisch), 1678  $\text{cm}^{-1}$  (C=O);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 600.1 MHz):  $\delta$  (ppm) = 2.57 (t, 2H,  $J$  = 6.5 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.09 (t, 2H,  $J$  = 6.5 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.86 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.83 (ddd, 1H,  $J$  = 7.8/7.6/1.6 Hz, ArH), 6.88 (ddd, 1H,  $J$  = 7.8/7.6/1.2 Hz, ArH), 6.98 (dd, 1H,  $J$  = 7.9/1.2 Hz, ArH), 7.32 (dd, 1H,  $J$  = 7.9/1.6 Hz, ArH), 7.37 (dd, 1H,  $J$  = 8.0/4.4 Hz, ArH), 7.40 (dd, 1H,  $J$  = 8.0/1.7 Hz, ArH), 8.15 (s, 1H, NH), 8.42 (dd, 1H,  $J$  = 4.4/1.7 Hz, ArH), 9.82 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 150.9 MHz):  $\delta$  (ppm) = 55.9 ( $\text{OCH}_3$ ); 29.0, 30.7 (sek. C); 111.0, 112.9, 120.2, 121.2, 123.8, 129.6, 146.0 (tert. C); 134.3, 134.6, 144.3, 145.7, 148.1, 173.1 (quart. C);  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$  (296.32); ber. C 64.85, H 5.44, N 18.91; gef. C 64.75, H 5.42, N 18.59; HPLC: 99.9% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm,  $t_N$  = 3.09 min,  $t_M$  = 1.14 min (ACN/Puffer (pH = 2-3); 20:80),  $\lambda_{\max}$ : 242 nm und 328 nm.

4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**52**)

3,4-Dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**24a**; 701 mg, 4.00 mmol) wird in *N,N*-Dimethylformamid-dimethylacetal (14 ml) für 1 h bei 115-120 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz für 12 h im Kühlschrank aufbewahrt. Ein entstandener Niederschlag wird abgesaugt, mit Petrolether gewaschen und aus Ethanol 96% umkristallisiert. Es werden 582 mg (63%) gelbe Kristalle erhalten.

Schmp.: 218-219 °C (Lit.<sup>94</sup>: 219 °C)

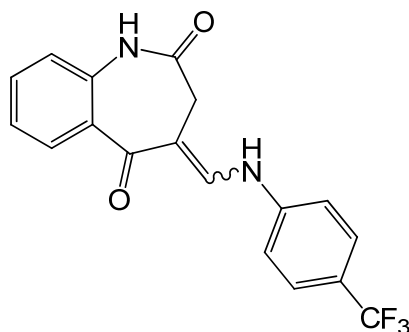
(4*EZ*)-4-(Anilinomethyliden)-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54a**)

Nach AAV 5 aus 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**52**; 345 mg, 1.50 mmol) und Anilin (**53a**; 137 µl, 1.50 mmol). Reaktionsdauer 21 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% werden 373 mg (89%) gelbe Kristalle erhalten.

Schmp.: 218-219 °C (Lit.<sup>94</sup>: 221 °C)



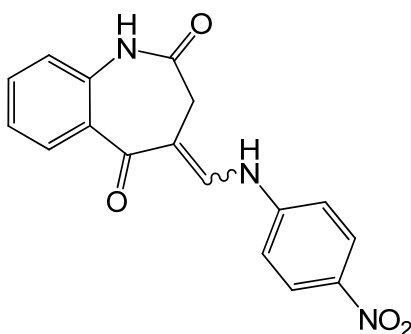
(4*EZ*)-4-{[4-(Trifluoromethyl)anilino]methyliden}-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion  
**(54b)**



Nach AAV 5 aus 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**52**; 161 mg, 0.700 mmol) und 4-(Trifluoromethyl)anilin (**53b**; 87  $\mu$ l, 0.70 mmol). Reaktionsdauer: 24 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% werden 158 mg (65%) gelbe Kristalle erhalten.

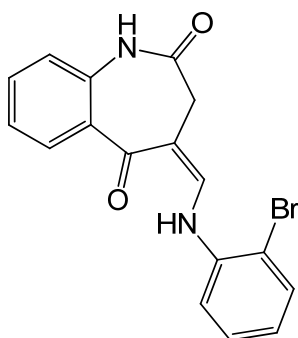
Schmp.: 239-240 °C (Lit.<sup>94</sup>: 242 °C)

(4*EZ*)-4-{[4-Nitroanilino]methyliden}-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**54c**)



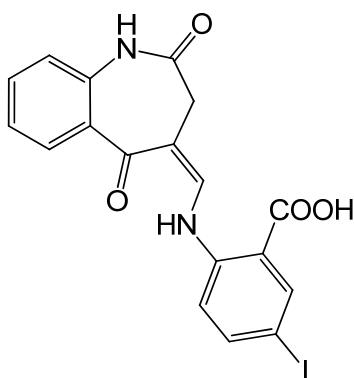
Nach AAV 5 aus 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**52**; 115 mg, 0.500 mmol) und 4-Nitroanilin (**53c**; 69 mg, 0.50 mmol). Reaktionsdauer: 79 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% werden 122 mg (66%) orangefarbene Kristalle erhalten.

Schmp.: 304-305 °C schwarze Schmelze (Lit.<sup>94</sup>: 299 °C)

(4Z)-4-[(2-Bromanilino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-1-benzazepin-2,5-dion (**54d**)

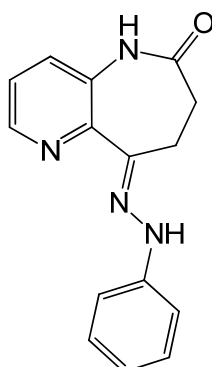
Nach AAV 5 aus 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**52**; 115 mg, 0.500 mmol) und 2-Bromanilin (**53d**; 54  $\mu$ l, 0.50 mmol). Reaktionsdauer: 72 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% werden 133 mg (66%) gelbe Kristalle erhalten.

Schmp.: 272-273 °C schwarze Schmelze (Lit.<sup>94</sup>: 273 °C)

2-[[4Z)-(2,5-Dioxo-1,2,3,5-tetrahydro-4*H*-1-benzazepin-4-yliden)methyl]amino}-5-iodbenzoesäure (**54e**)

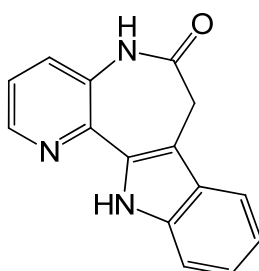
Nach AAV 5 aus 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**52**; 173 mg, 0.750 mmol) und 2-Amino-5-iodbenzoesäure (**53e**; 197 mg, 0.750 mmol). Reaktionsdauer: 105 h. Nach Umkristallisation aus Ethanol 96% werden 133 mg (36%) gelbe Kristalle erhalten.

Schmp.: 298-299 °C schwarze Schmelze (Lit.<sup>94</sup>: 299 °C)

7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-phenylhydrazon (**67**)

Nach AAV 4 aus 7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion (**24b**; 176 mg, 1.00 mmol) und Phenylhydrazin (**66**; 0.15 ml, 1.5 mmol). Nach Eingießen in die Natriumacetat-Lösung wird mit Ethylacetat (4 x 20 ml) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach Umkristallisation des erhaltenen Niederschlags aus Ethanol 96% werden 122 mg (46%) eines orangefarbenen Pulvers erhalten.

Schmp.: 195-196 °C (Lit.<sup>77</sup>: 206 °C)

7,12-Dihydropyrido[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**68**)

7,8-Dihydro-5*H*-pyrido[3,2-*b*]azepin-6,9-dion-9-phenylhydrazon (**67**; 265 mg, 1.00 mmol) wird in Diphenylether (90 ml) unter Stickstoffatmosphäre für 1 h zum Reflux erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz auf *n*-Hexan (150 ml) gegossen. Ein sich bildender Niederschlag wird abgesaugt, mit viel Petrolether gewaschen und aus Ethanol 96% umkristallisiert. Es werden 131 mg (53%) eines hellbraunen Pulvers erhalten.

Schmp.: ab 280 °C Zersetzung (Lit.<sup>77</sup>: > 330 °C)

## **Anhang zu Kapitel 8.2: Gefahrstoffverzeichnis**

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Gefahrstoffe müssen unter Beachtung der einschlägigen Gefahren- und Sicherheitshinweise (H- und P-Hinweise, *hazard and precautionary statements*) gehandhabt werden. Bei den im Folgenden aufgeführten Chemikalien sind besondere Gefahren zu beachten.

Die Kennzeichnung und Einstufung der Substanzen richtet sich nach der **CLP-Verordnung** (Regulation on **C**lassification, **L**abelling and **P**ackaging of Substances and Mixtures-Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen), die am 20. Januar 2009 in Kraft getreten ist.

### **Anilin und seine Derivate**

Gefahrenpiktogramme: GHS06, GHS08, GHS05, GHS09.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H351: Kann vermutlich Krebs erzeugen. H341: Kann vermutlich genetische Defekte verursachen. H331: Giftig bei Einatmen. H311: Giftig bei Hautkontakt. H301: Giftig bei Verschlucken. H372: Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition. H318: Verursacht schwere Augenschäden. H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H400: Sehr giftig für Wasserorganismen.

Sicherheitshinweise: P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P308+ P313: Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P302+352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

### **Bortrifluorid-Etherat**

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS06, GHS05, GHS08.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H226: Flüssigkeit und Dampf entzündbar. H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. H330: Lebensgefahr bei Einatmen. H372: Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze schützen. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen. P304+P340: Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

### **Brom**

Gefahrenpiktogramme: GHS06, GHS05, GHS09.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H330: Lebensgefahr beim Einatmen. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. H400: Sehr giftig für Wasserorganismen.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze schützen. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P304+340: Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. P403+P233: Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

### **tert-Butylmethylether**

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS07.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. H315: Verursacht Hautreizungen.

Sicherheitshinweise: P210: Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.

### **Chlorwasserstoff-Gas**

Gefahrenpiktogramme: GHS06, GHS05, GHS04.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H331: Giftig bei Einatmen. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren. EUH071: Wirkt ätzend auf die Atemwege.

Sicherheitshinweise: P260: Gas/Dampf nicht einatmen. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P304+P340+P315: Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P303+P361+P353+P315: Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle verschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P305+P351+P338+P315: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P405: Unter Verschluss aufbewahren. P403: An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

### **Dichlormethan**

Gefahrenpiktogramm: GHS08.

Signalwort: Achtung.

Gefahrenhinweise: H351: Kann vermutlich Krebs erzeugen.

Sicherheitshinweise: P281: Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden. P308+P313: Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

### **N,N-Dimethylformamid**

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS08, GHS07.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H360D: Kann das Kind im Mutterleib schädigen. H226: Flüssigkeit und Dampf entzündbar. H332: Gesundheitsschädlich bei Einatmen. H312: Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt. H319: Verursacht schwere Augenreizung.

Sicherheitshinweise: P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

P308+P313: Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

### **Ethyldiisopropylamin**

Gefahrenpiktogramme: GHS03, GHS06, GHS05.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. H301: Giftig bei Verschlucken. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

Sicherheitshinweise: P210: Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

### **Kaliumhydrid**

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H260: In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. EUH014: Reagiert heftig mit Wasser.

Sicherheitshinweise: P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen. P305+P351: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P402+P404: In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren.

### **Kalium-*tert*-butylat**

Gefahrenpiktogramme: GHS03, GHS05, GHS07.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H260: In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können. H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. EUH014: Reagiert heftig mit Wasser.

Sicherheitshinweise: P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. P402+P404: In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren.

### **Natrium**

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H260: In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. EUH014: Reagiert heftig mit Wasser.

Sicherheitshinweise: P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. P370+P378: Bei Brand: Metallbrandpulver zum Löschen verwenden. P422: Inhalt unter Schutzflüssigkeit aufbewahren.

### **Phenylhydrazin und seine Derivate**

Gefahrenpiktogramme: GHS08, GHS06, GHS09.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H350: Kann Krebs erzeugen. H341: Kann vermutlich genetische Defekte verursachen. H331: Giftig bei Einatmen. H311: Giftig bei Hautkontakt. H301: Giftig bei Verschlucken. H372: Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition. H319: Verursacht schwere Augenreizung. H315: Verursacht Hautreizungen.



H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H400: Sehr giftig für Wasserorganismen.

Sicherheitshinweise: P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. P281: Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P304+P340: Bei Einatmen an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. P309+310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

### **Pyridin**

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS07.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. H332: Gesundheitsschädlich bei Einatmen. H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H312: Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze schützen. P233: Behälter dicht verschlossen halten. P302+352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.

### **Tetrahydrofuran**

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS07.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. H319: Verursacht schwere Augenreizung. H335: Kann die Atemwege reizen. EUH019: Kann explosionsfähige Peroxide bilden.

Sicherheitshinweise: P210: Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. P233: Behälter dicht verschlossen halten. P243: Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

### **Triphenylboran**

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: H318: Verursacht schwere Augenschäden. H228: Entzündbarer Feststoff.

Sicherheitshinweise: P210: Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. P240: Behälter und zu befüllende Anlage erden. P241: Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel/Lüftungsanlagen/Beleuchtung verwenden. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P310: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

### 8.3 Spektroskopische Daten

#### 8.3.1 Absorptions- und Emissionsspektren

Zur Herstellung der Lösungen wurde Acetonitril (ACN) als Lösungsmittel verwendet und eine Substanzkonzentration von ca. 0.04 mmol/l eingesetzt, indem die jeweils aufgeführte Einwaage in 10.0 ml ACN gelöst und davon 1.0 ml zu 25.0 ml mit ACN verdünnt wurde. Die Geräteeinstellungen sind in Kapitel 8.1.1 beschrieben. Ein molarer Absorptionskoeffizient  $\varepsilon$  wurde jeweils im langwelligsten Maximum nach folgender Gleichung:

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot d}$$

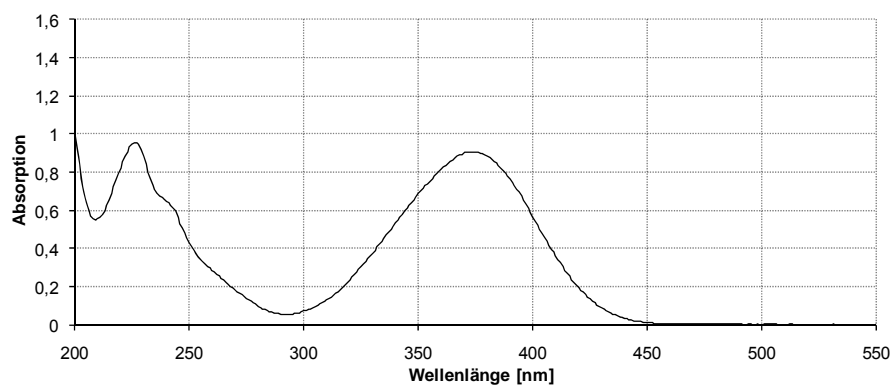
mit der Konzentration  $c$  (mol/l), der Schichtdicke  $d$  (cm) und der gemessenen Absorption  $A$  berechnet.

**Verbindung 22a**

Einwaage: 3.29 mg

Absorptionsspektrum

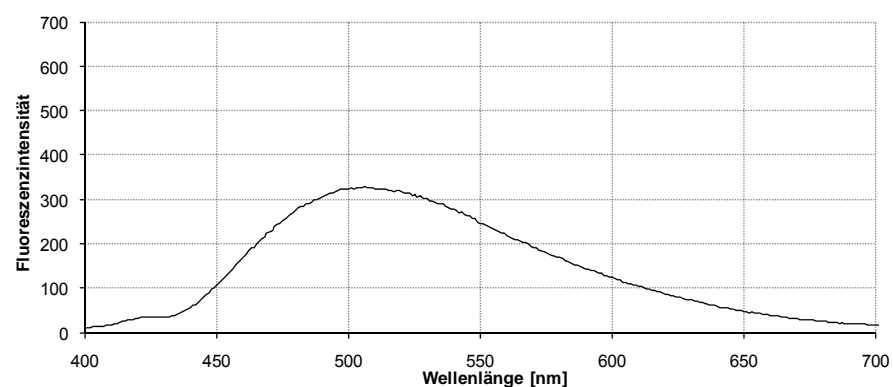
Max.: 227 nm, 374 nm

 $\varepsilon = 2.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 

Emissionsspektrum

Max.: 506 nm

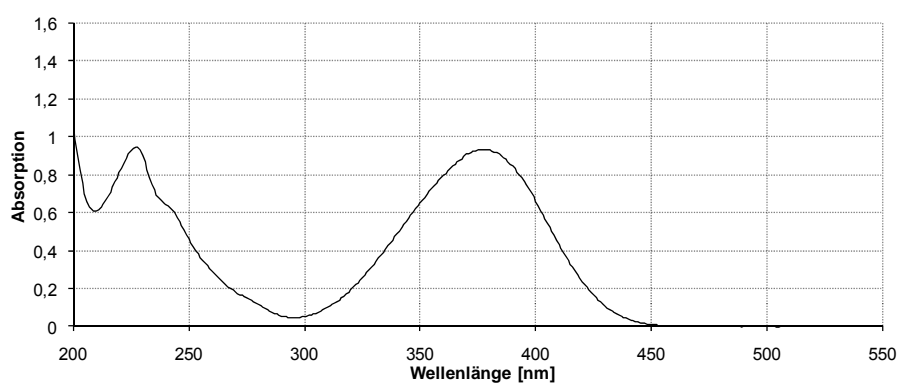
Stokes' Shift: 132 nm

**Verbindung 22b**

Einwaage: 3.97 mg

Absorptionsspektrum

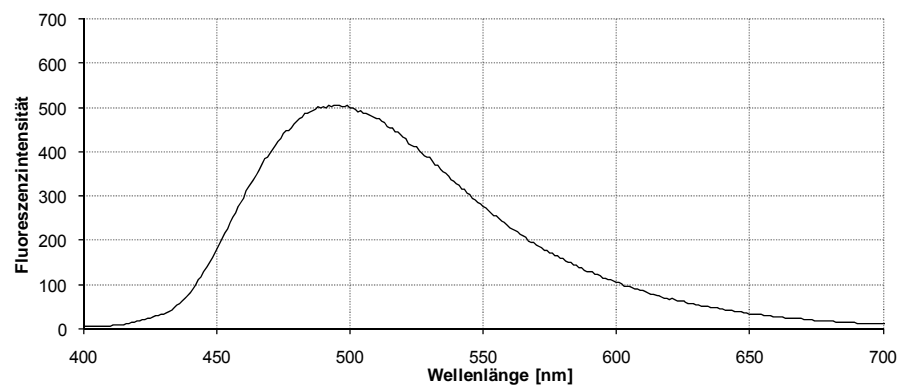
Max.: 227 nm, 377 nm

 $\varepsilon = 2.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 

Emissionsspektrum

Max.: 494 nm

Stokes' Shift: 117 nm



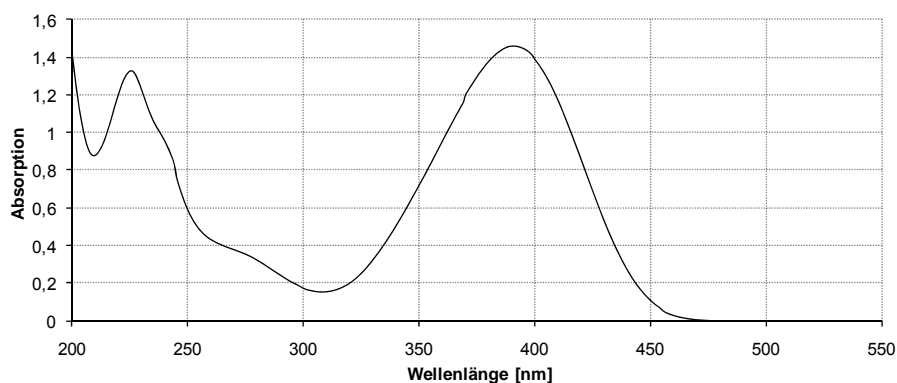
### Verbindung 22c

Einwaage: 3.75 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 226 nm, 391 nm

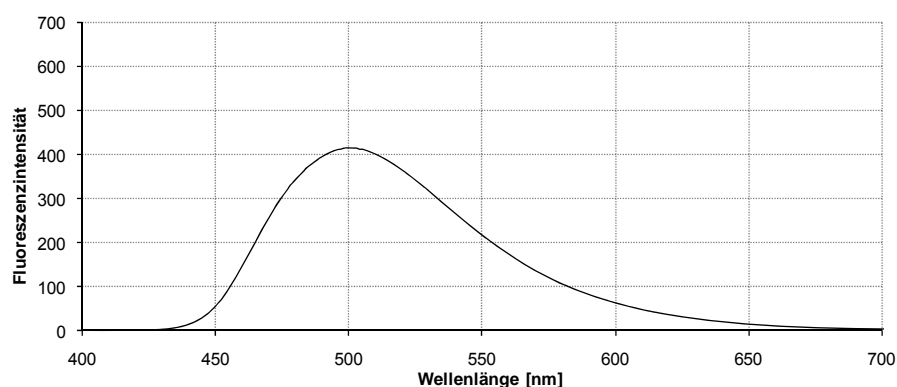
$\varepsilon = 2.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$



Emissionsspektrum

Max.: 499 nm

Stokes' Shift: 108 nm



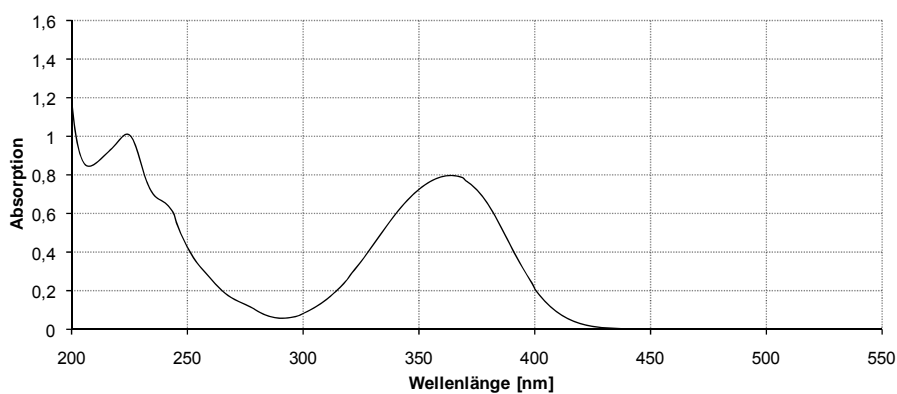
### Verbindung 22d

Einwaage: 4.03 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 224 nm, 364 nm

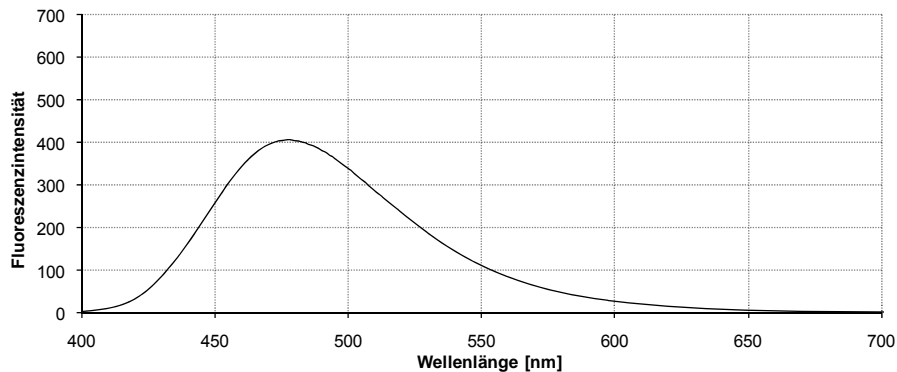
$\varepsilon = 2.0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$



Emissionsspektrum

Max.: 478 nm

Stokes' Shift: 114 nm



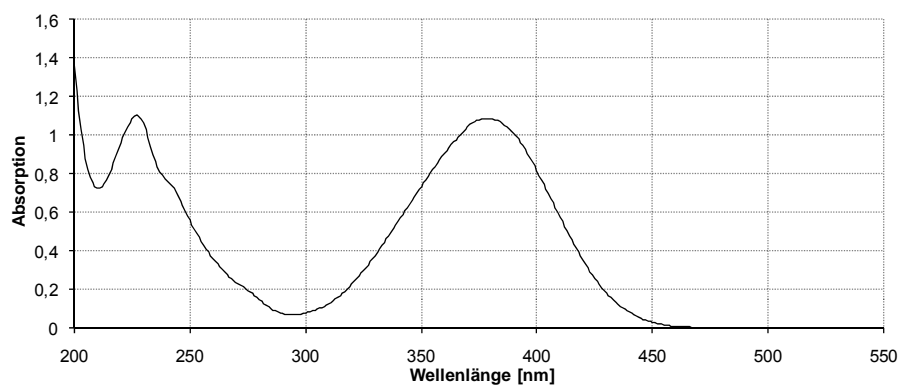
**Verbindung 22f**

Einwaage: 4.28 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 227 nm, 378 nm

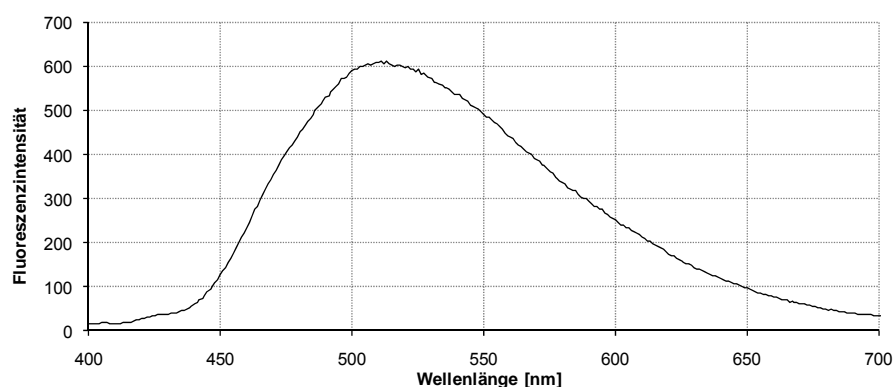
$$\varepsilon = 2.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$



Emissionsspektrum

Max.: 511 nm

Stokes' Shift: 133 nm

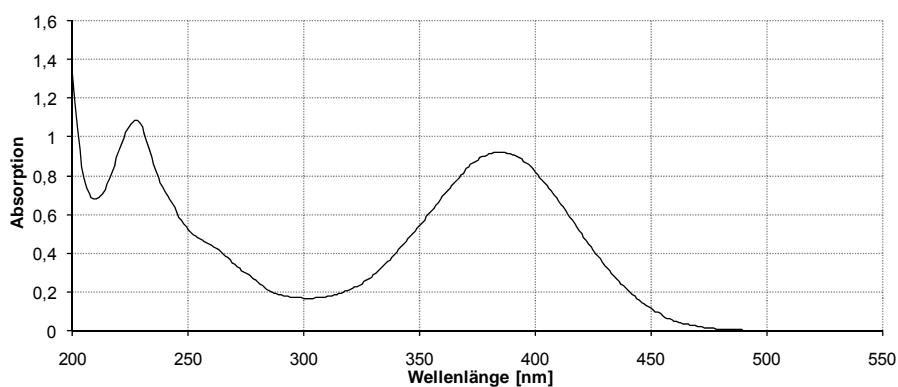
**Verbindung 22g**

Einwaage: 3.71 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 227 nm, 385 nm

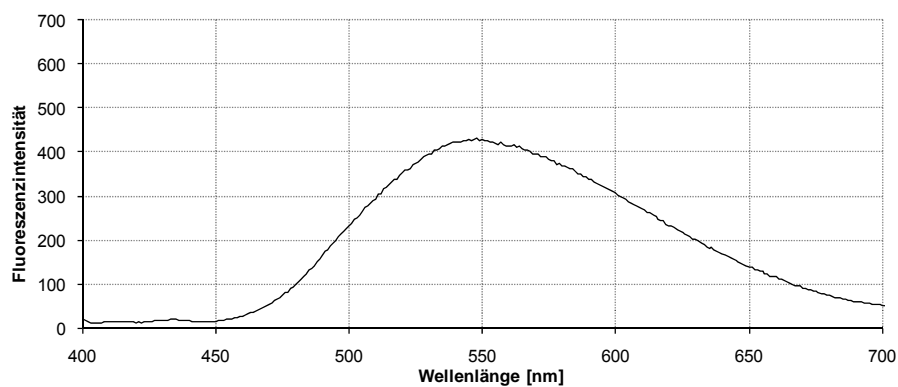
$$\varepsilon = 2.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$



Emissionsspektrum

Max.: 548 nm

Stokes' Shift: 163 nm



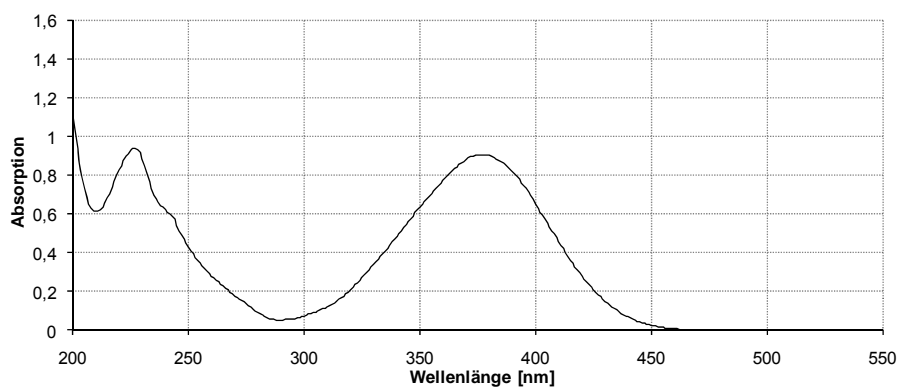
### Verbindung 22h

Einwaage: 3.54 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 227 nm, 377 nm

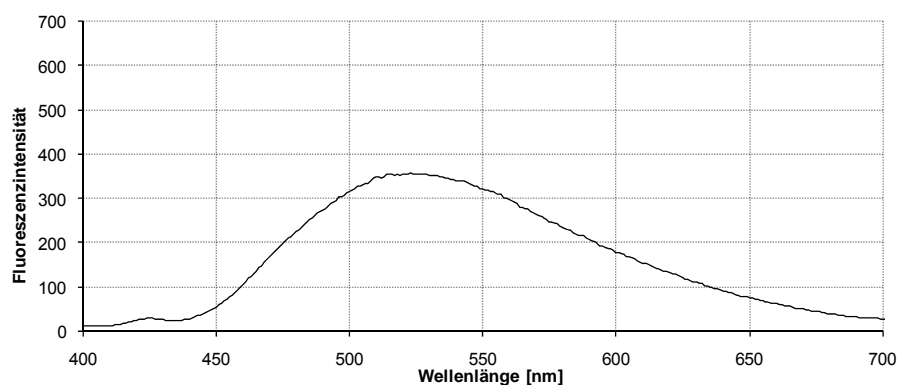
$\varepsilon = 2.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$



Emissionsspektrum

Max.: 518 nm

Stokes' Shift: 141 nm



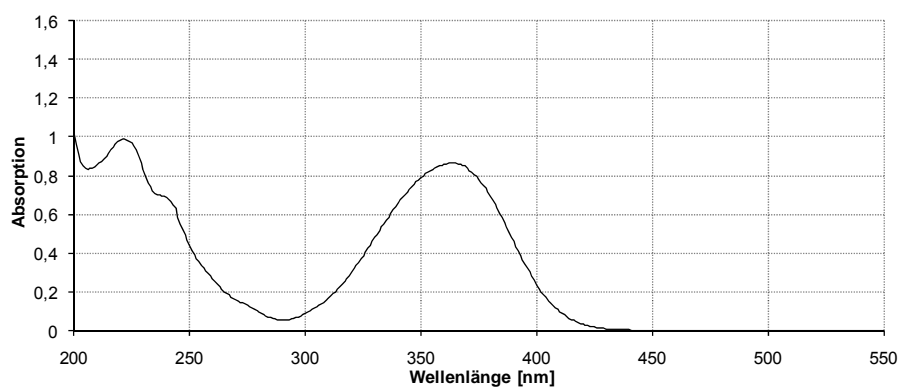
### Verbindung 22i

Einwaage: 3.60 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 212 nm, 364 nm

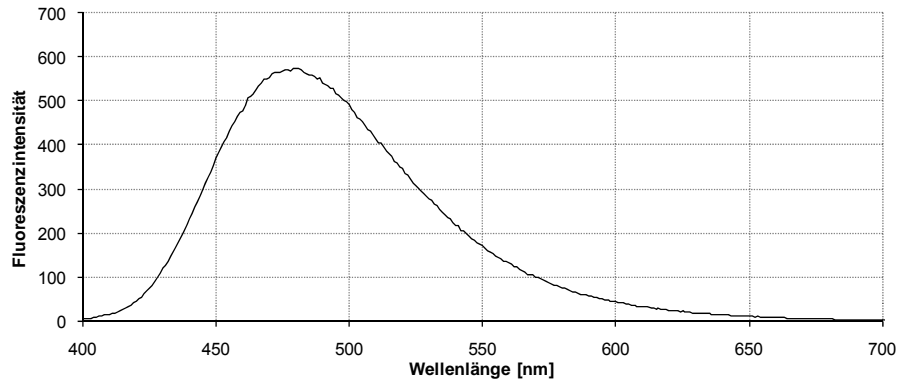
$\varepsilon = 2.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$



Emissionsspektrum

Max.: 479 nm

Stokes' Shift: 115 nm

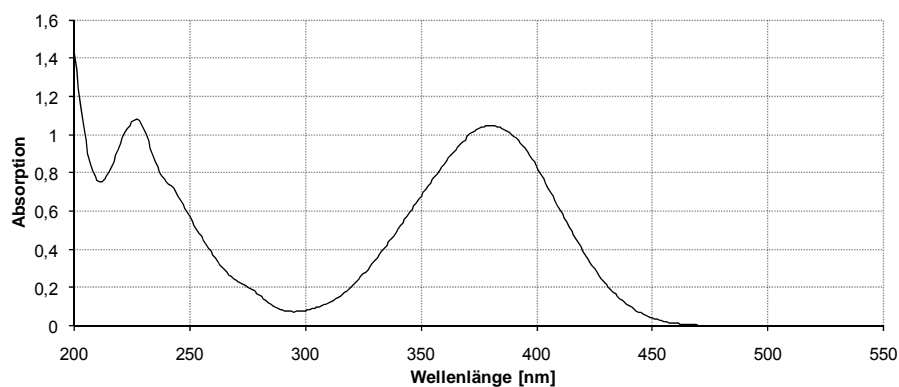


**Verbindung 22j**

Einwaage: 4.72 mg

Absorptionsspektrum

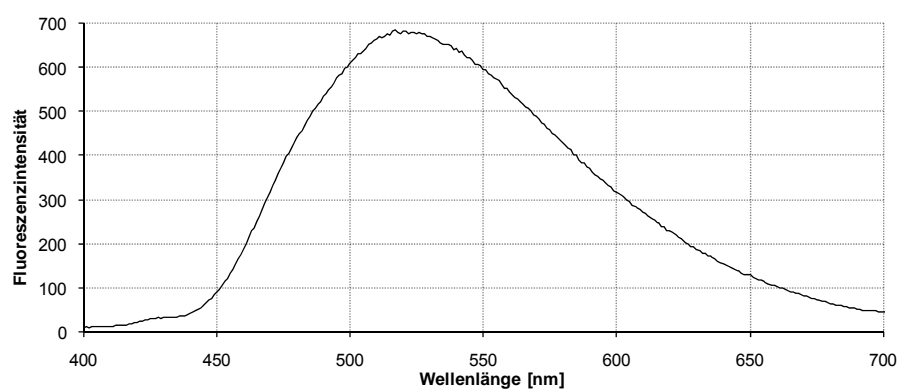
Max.: 227 nm, 380 nm

 $\varepsilon = 2.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 

Emissionsspektrum

Max.: 517 nm

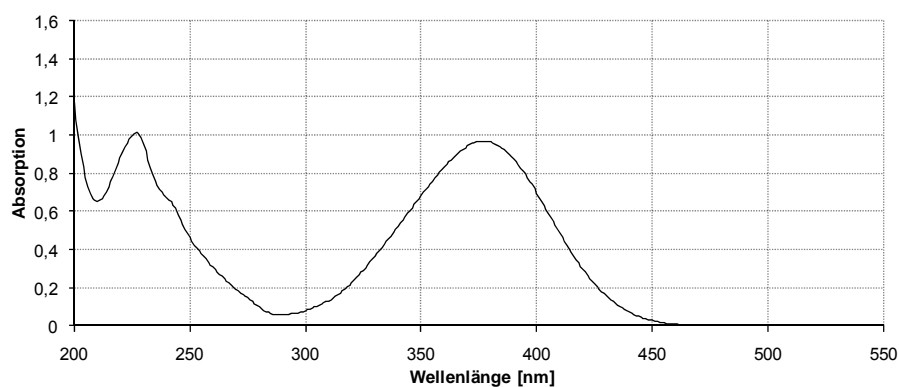
Stokes' Shift: 137 nm

**Verbindung 22k**

Einwaage: 3.43 mg

Absorptionsspektrum

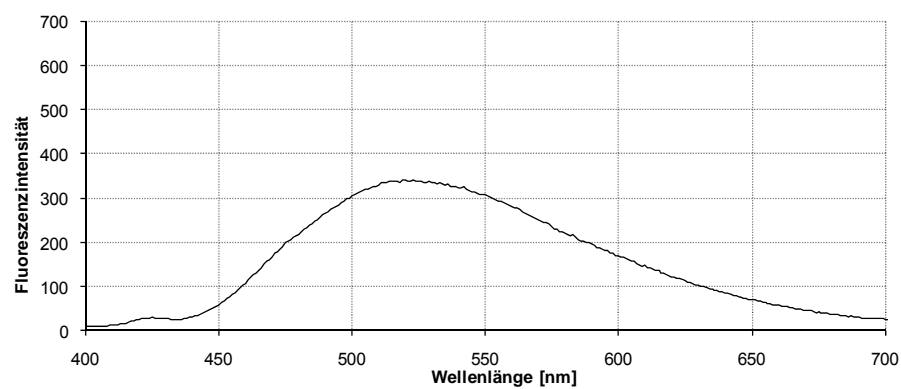
Max.: 227 nm, 377 nm

 $\varepsilon = 2.4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 

Emissionsspektrum

Max.: 519 nm

Stokes' Shift: 142 nm



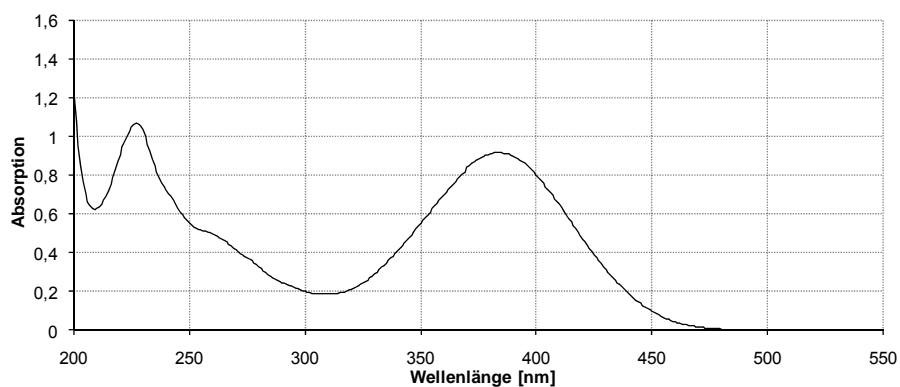
### Verbindung 22l

Einwaage: 3.59 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 227 nm, 384 nm

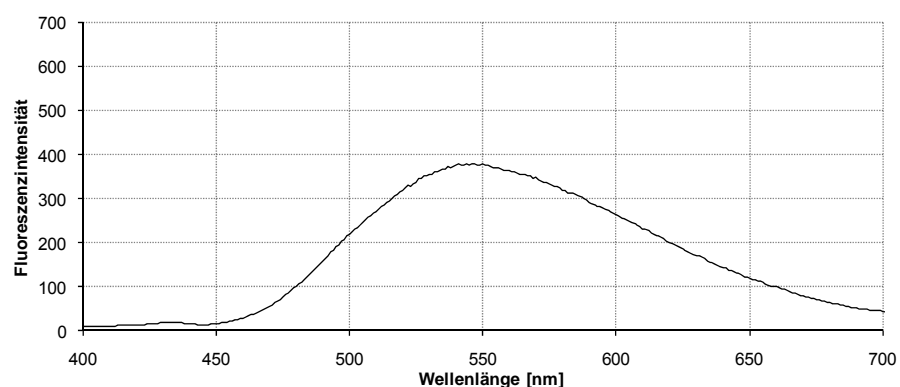
$$\varepsilon = 2.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$



Emissionsspektrum

Max.: 547 nm

Stokes' Shift: 163 nm



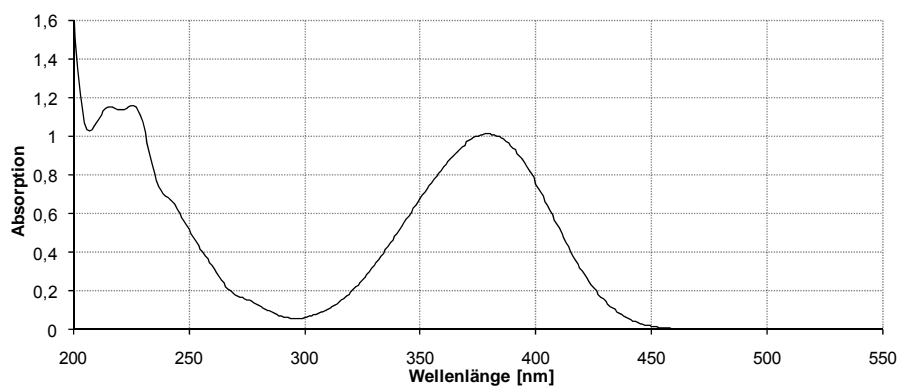
### Verbindung 22m

Einwaage: 3.94 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 226 nm, 379 nm

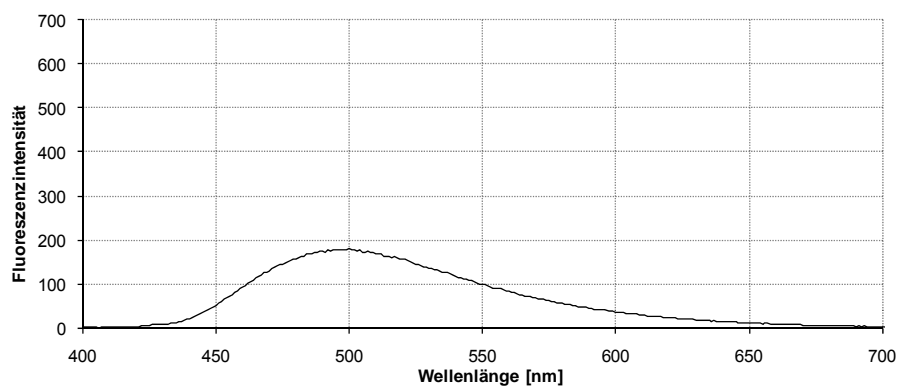
$$\varepsilon = 2.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$



Emissionsspektrum

Max.: 500 nm

Stokes' Shift: 121 nm





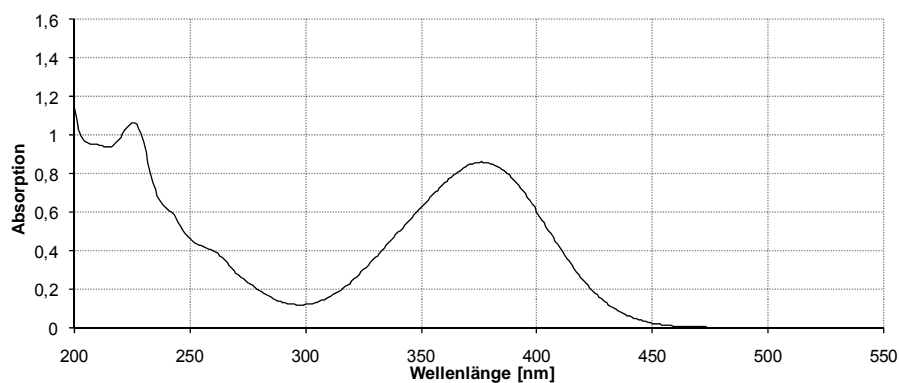
**Verbindung 22n**

Einwaage: 3.55 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 226 nm, 376 nm

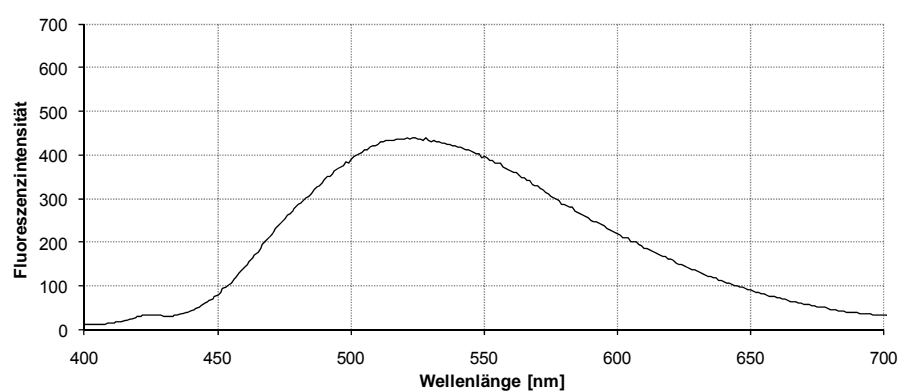
$$\varepsilon = 2.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$



Emissionsspektrum

Max.: 524 nm

Stokes' Shift: 148 nm

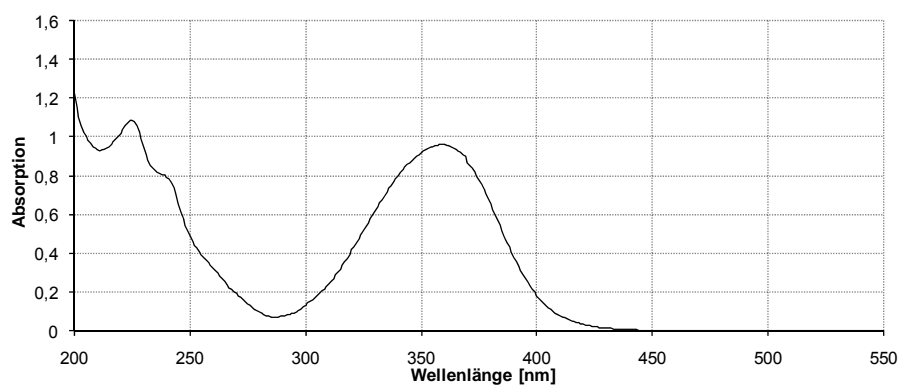
**Verbindung 22r**

Einwaage: 3.40 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 225 nm, 359 nm

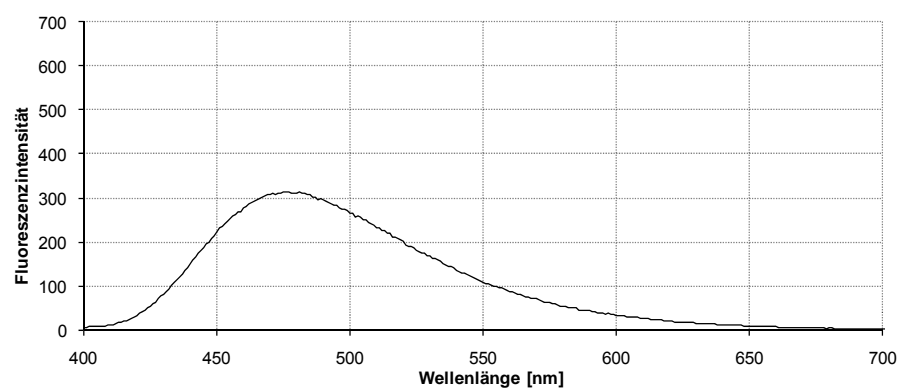
$$\varepsilon = 2.4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$



Emissionsspektrum

Max.: 476 nm

Stokes' Shift: 117 nm



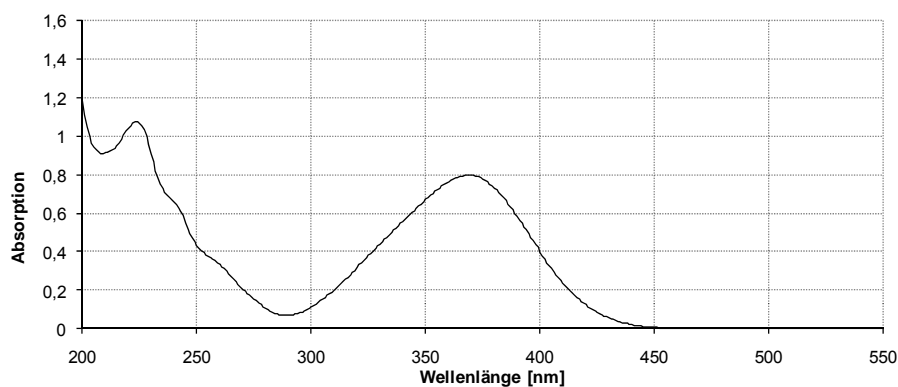
### Verbindung 22s

Einwaage: 3.59 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 224 nm, 369 nm

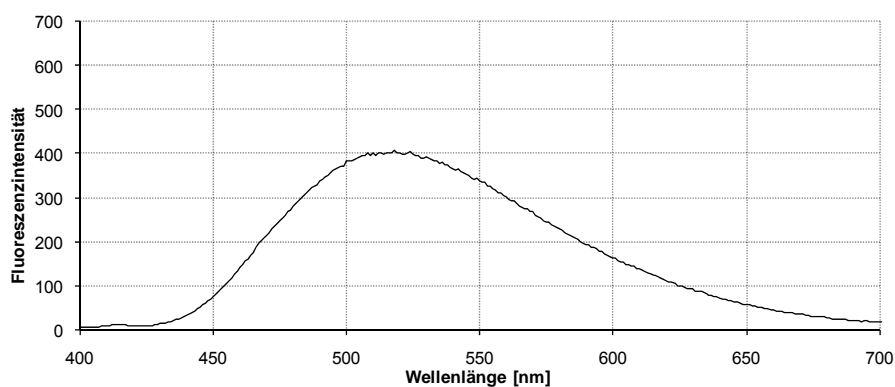
$\varepsilon = 2.0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$



Emissionsspektrum

Max.: 518 nm

Stokes' Shift: 149 nm



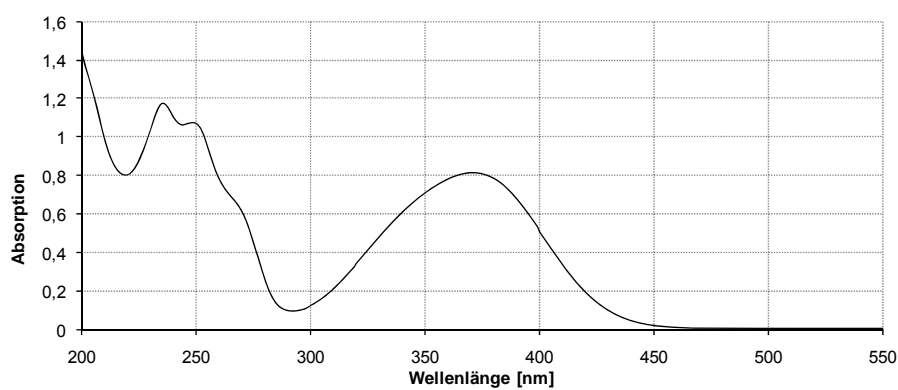
### Verbindung 22u

Einwaage: 5.17 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 235 nm, 248 nm, 370 nm

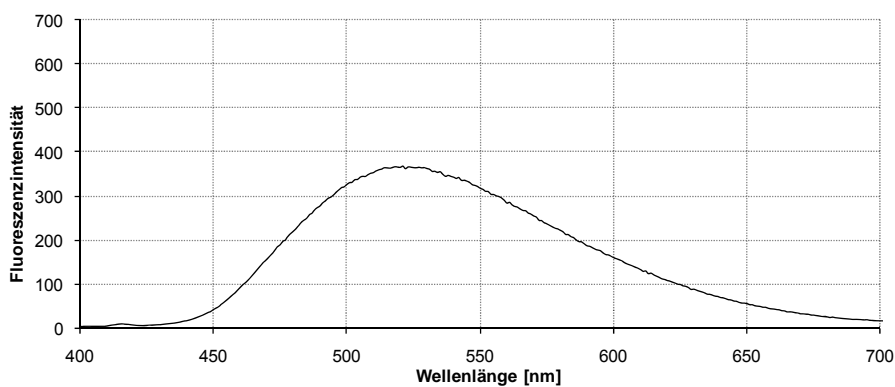
$\varepsilon = 1.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$



Emissionsspektrum

Max.: 521 nm

Stokes' Shift: 150 nm



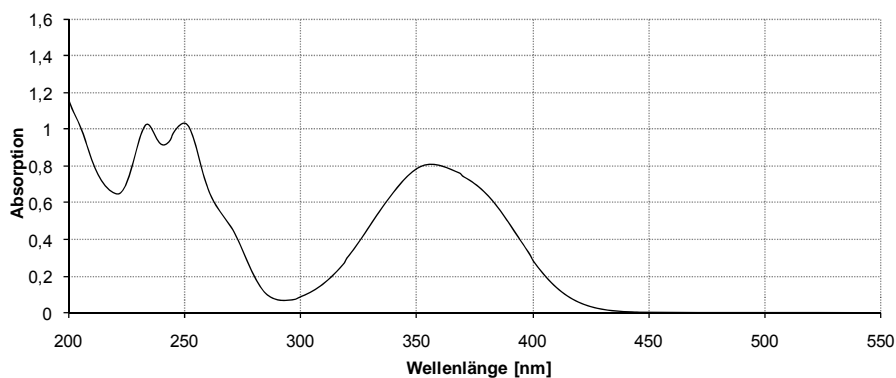
**Verbindung 22v**

Einwaage: 4.13 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 234 nm, 250 nm,  
356 nm

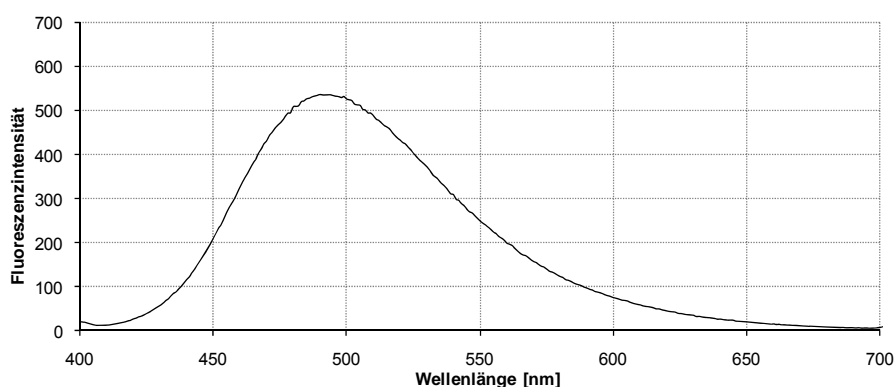
$$\varepsilon = 2.4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$



Emissionsspektrum

Max.: 490 nm

Stokes' Shift: 134 nm

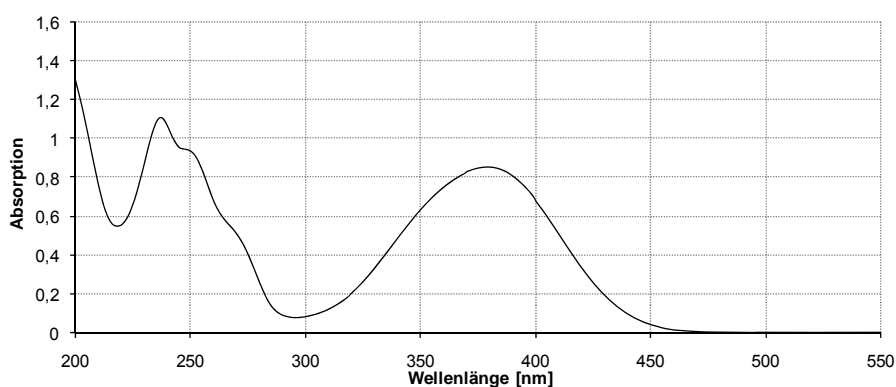
**Verbindung 22w**

Einwaage: 4.62 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 237 nm, 379 nm

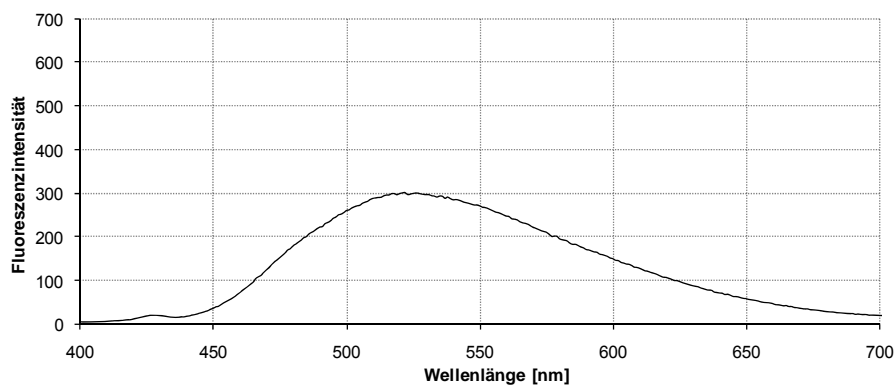
$$\varepsilon = 2.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$



Emissionsspektrum

Max.: 523 nm

Stokes' Shift: 144 nm



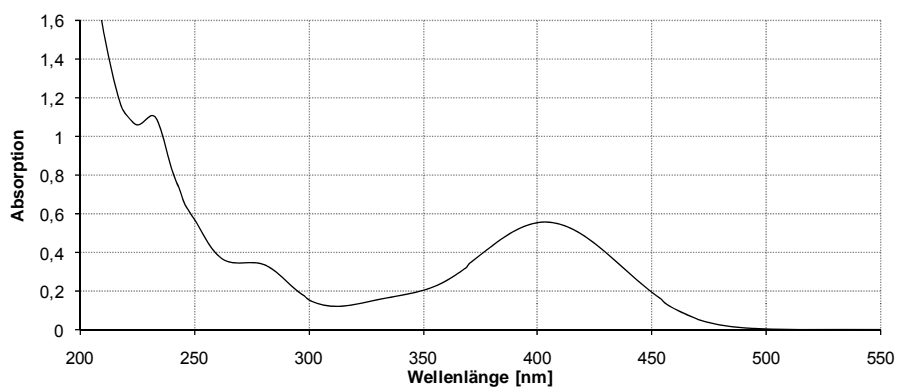
### Verbindung 23a

Einwaage: 4.43 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 231 nm, 403 nm

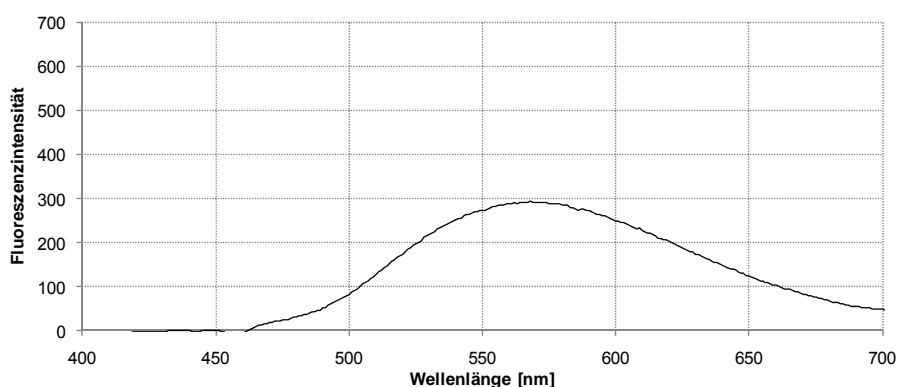
$$\varepsilon = 1.4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$



Emissionsspektrum

Max.: 568 nm

Stokes' Shift: 165 nm



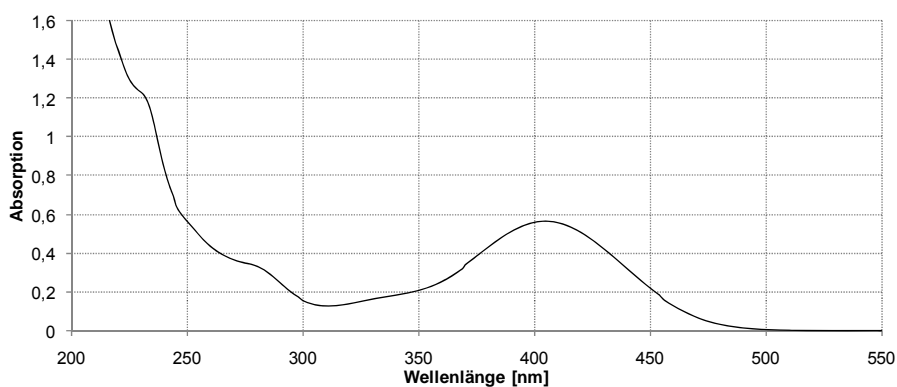
### Verbindung 23b

Einwaage: 4.77 mg

Absorptionsspektrum

Max.: 404 nm

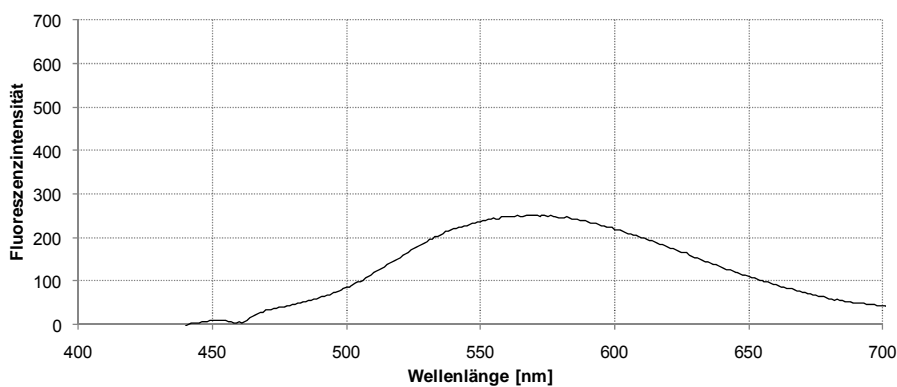
$$\varepsilon = 1.4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$



Emissionsspektrum

Max.: 570 nm

Stokes' Shift: 166 nm

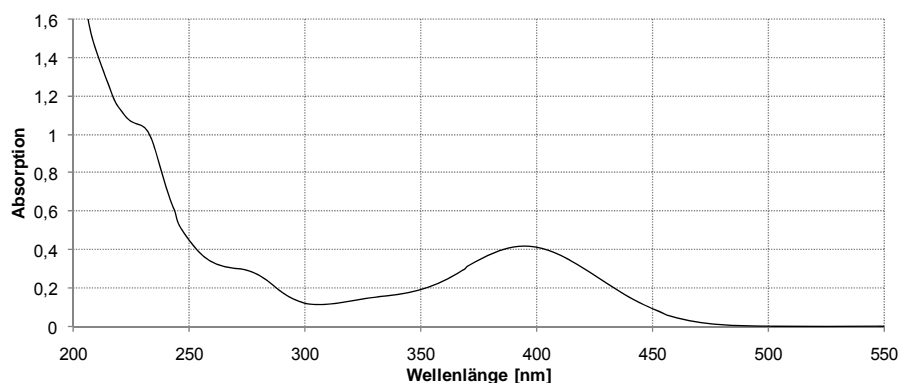


**Verbindung 23c**

Einwaage: 4.56 mg

Absorptionsspektrum

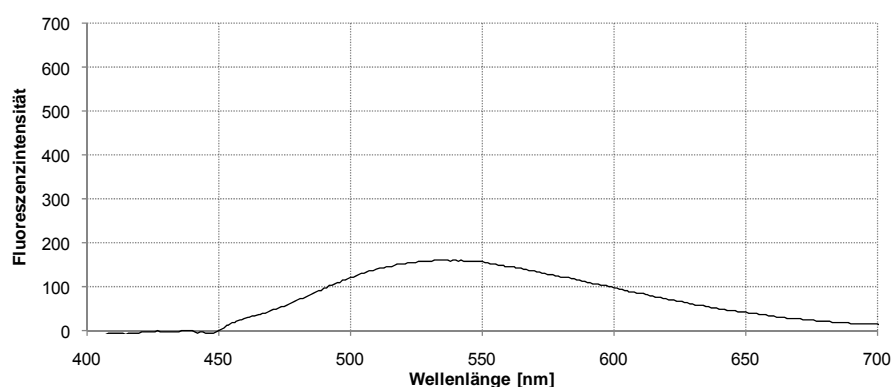
Max.: 395 nm

 $\varepsilon = 1.1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 

Emissionsspektrum

Max.: 540 nm

Stokes' Shift: 145 nm

**8.4 Biologische Daten****8.4.1 Assay zur Kinaseinhibition mit 16 Proteinkinasen**

In einem *in vitro*-Assay wurde die kinaseinhibitorische Aktivität der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Verbindungen durch die Firma ProQinase GmbH, Freiburg untersucht.

Der Proteinkinase-Assay umfasste 16 Proteinkinasen (AKT1, ALK, ARK5, Aurora B, AXL, FAK, IGF1-R, MEK1, MET, NEK2, NEK6, PIM1, PLK1, PRK1, SRC und VEGF-R2). Sie wurden als humane, rekombinante GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteine oder (His)<sub>6</sub>-tagged Proteine in Sf9-Insektenzellen oder E.coli exprimiert und durch Affinitätschromatographie an GSH (Glutathion)-Agarose (Sigma) oder Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure)-Agarose (Quiagen) isoliert. Zur Überprüfung der Reinheit wurde eine SDS-PAGE/Silberfärbung durchgeführt und die Identität jeder Proteinkinase durch Massenspektroskopie festgestellt.

In einem radiometrischen <sup>33</sup>PanQinase<sup>®</sup> Activity Assay wurde unter Verwendung von radioaktiv markiertem [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-ATP die Phosphorylierungsaktivität der Enzyme gegen-

über einem jeweils spezifischen Substrat bestimmt. Hierfür wurde das an das Substrat gebundene  $\gamma$ - $^{33}\text{P}$  vermessen.

Durchgeführt wurden die Kinase-Assays in 96-well FlashPlates™ (Fa. Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Das Reaktionsvolumen betrug 50  $\mu\text{l}$ , welches aus den folgenden Komponenten in der beschriebenen Reihenfolge zusammengesetzt wurde:

20  $\mu\text{l}$  Standardpuffer

5  $\mu\text{l}$  ATP-Lösung (in  $\text{H}_2\text{O}$ )

5  $\mu\text{l}$  Probelösung (in 10% DMSO)

20  $\mu\text{l}$  einer Mischung aus je 10  $\mu\text{l}$  Substrat- und Enzym-Lösung.

Der Assay für alle Enzyme enthielt 60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM  $\text{MnCl}_2$ , 3  $\mu\text{M}$  Na-*ortho*-Vanadat, 1.2 mM DTT, 50  $\mu\text{g/ml}$  PEG<sub>20000</sub>, 1  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ ]-ATP (ca.  $7.5 \times 10^5$  cpm/Well). Die eingesetzten Konzentrationen von Enzym und Substrat sind in Tabelle 8-13 aufgeführt.

**Tabelle 8-13:** Konzentrationen der getesteten Kinasen und ihrer Substrate

Kinase	Kinase c [ng/50 $\mu\text{l}$ ]	Substrat	Substrat c [ng/50 $\mu\text{l}$ ]
<b>AKT1</b>	25	GSK3(14-27), Lot 010	2000
<b>ALK</b>	10	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>	125
<b>ARK5</b>	50	RB-R-CHKtide, Lot 024	2000
<b>Aurora B</b>	100	Tetra(LRRWSLG), Lot 006	500
<b>AXL</b>	25	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>	250
<b>FAK</b>	25	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>	125
<b>IGF1-R</b>	10	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>	125
<b>MEK1</b>	50	ERK2-KR, Lot 006	2000
<b>MET</b>	25	Poly(Ala,Glu,Lys,Tyr) <sub>6:2:5:1</sub>	125
<b>NEK2</b>	100	RB-CTF, Lot 012	1000
<b>NEK6</b>	20	GSK3(14-27), Lot 010	2000
<b>PIM1</b>	3	GSK3(14-27), Lot 010	1000
<b>PLK1</b>	15	RB-R-CHKtide, Lot 024	2000
<b>PRK1</b>	25	RB-R-CHKtide, Lot 024	2000
<b>SRC</b>	10	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>	125
<b>VEGF-R2</b>	25	Poly(Glu,Tyr) <sub>4:1</sub>	125

Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion mit 50  $\mu\text{l}$  einer 2%igen (v/v) Phosphorsäure gestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit 200  $\mu\text{l}$  einer 0.9%igen Natriumchlorid-Lösung wurde die Einlagerung des  $^{33}\text{P}$  in das jeweilige

Substrat mit einem Mikroplatten-Szintillationszähler (Microbeta, Trilux, Wallac) bestimmt. Die Durchführung aller Assays erfolgte mit einem BeckmanCoulter/Sagian<sup>TM</sup>-Roboter System.

Die enzymatischen Restaktivität unter Zusatz der zu untersuchenden Substanzen wurde ermittelt. Hierfür wurde zunächst die 100%-Kinaseaktivität aus der Differenz zwischen *high* und *low control*-Wert bestimmt. Der *high control*-Wert beschreibt die uneingeschränkte Enzymaktivität, die mit Proben erhalten wurde, die Substrat und Enzym, aber keinen Inhibitor enthalten. Dagegen repräsentiert der *low control*-Wert die unspezifische Bindung von Radioaktivität an die Mikrotiterplatte und wurde in Kontrollproben gemessen, die nur Substrat, aber weder Enzym noch Inhibitor enthalten.

Setzt man die Differenz dieser beiden Werte gleich 100%, so kann die Restaktivität nach folgender Gleichung ermittelt werden:

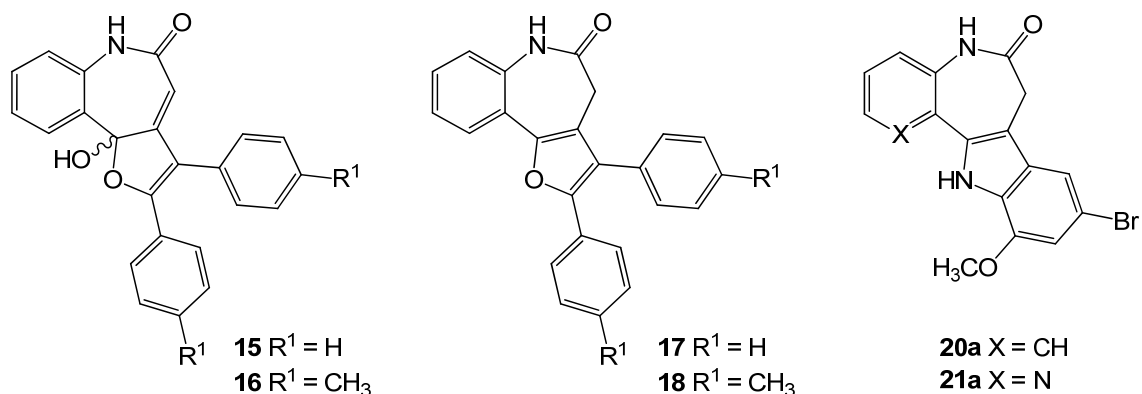
$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{\text{Messergebnis mit Testsubstanz} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100\%$$

Die prozentualen Restaktivitäten der untersuchten Verbindungen an den genannten Proteinkinasen sind in den Tabellen 8-14 und 8-16 aufgeführt.

Für Verbindungen, die bei 10 µM eine Hemmung einzelner Kinasen von > 80% oder bei 1 µM von > 60% zeigten sowie die drei am stärksten inhibitorisch wirksamen Substanzen der ALK-Untersuchung wurden die IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt (Tab. 8-15 und 8-17). Es wurden jeweils zehn Konzentrationen der Verbindungen im Bereich von 100 µM bis 3 nM einmalig vermessen und mit Hilfe des Programms Quattro Workflow V3.0.3 (Quattro Research GmbH, München) die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte durchgeführt.

Als Parameter für die Assay-Qualität wurde der Z'-Faktor für die Kontrollproben (*high* und *low control*) jeder Mikrotiterplatte (n = 8) ermittelt.<sup>174</sup> Für Z'-Faktoren unterhalb von 0.4 wird eine Wiederholung des Assays gefordert. Alle Werte der hier durchgeführten Assays lagen nicht unterhalb von 0.45 und meist oberhalb von 0.55, was auf eine sehr gute bis exzellente Assay-Qualität schließen lässt.

**Tabelle 8-14:** Prozentuale Restaktivität der 16 Kinasen in Gegenwart von **15**, **16**, **17**, **18**, **20a** oder **21a** [jeweils 10  $\mu$ M]



Kinase	15	17	16	18	20a	21a
<b>AKT1</b>	99	94	101	84	92	90
<b>ALK</b>	90	40	84	17	80	74
<b>ARK5</b>	102	101	76	91	84	65
<b>Aurora B</b>	93	96	110	97	89	74
<b>AXL</b>	89	83	86	46	80	90
<b>FAK</b>	78	69	73	45	88	90
<b>IGF1-R</b>	64	36	50	20	81	59
<b>MEK1</b>	115	52	128	105	107	108
<b>MET</b>	98	90	88	67	110	93
<b>NEK2</b>	114	99	108	90	107	87
<b>NEK6</b>	109	96	97	80	98	82
<b>PIM1</b>	101	81	102	72	69	40
<b>PLK1</b>	82	91	106	85	104	81
<b>PRK1</b>	94	94	99	88	92	76
<b>SRC</b>	65	30	40	20	49	39
<b>VEGF-R2</b>	74	38	56	26	63	55

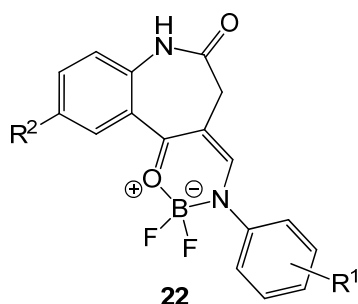
**Tabelle 8-15:**  $IC_{50}$ -Werte [ $\mu$ M] von **15**, **17** und **18** an 16 Kinasen<sup>a</sup>

Kinase	15	17	18	Kinase	15	17	18
<b>AKT1</b>	63			<b>MET</b>	54	75	27
<b>ALK</b>	36	6.2	3.3	<b>NEK2</b>	82		36
<b>ARK5</b>				<b>NEK6</b>	75	35	56
<b>Aurora B</b>	51			<b>PIM1</b>	89	37	



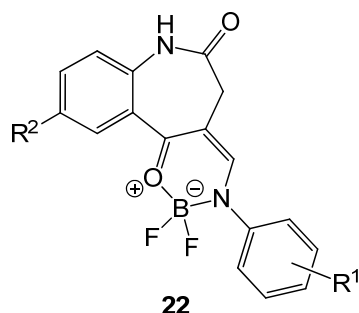
Tabelle 8-15: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] von **15**, **17** und **18** an 16 Kinasen<sup>a</sup> (Fortsetzung)

Kinase	15	17	18	Kinase	15	17	18
<b>AXL</b>	43	27	9.4	<b>PLK1</b>	40		
<b>FAK</b>	22	14	7.5	<b>PRK1</b>	93	99	28
<b>IGF1-R</b>	15	3.8	3.5	<b>SRC</b>	14	2.7	2.5
<b>MEK1</b>		100		<b>VEGF-R2</b>	25	15	7.8

<sup>a</sup> Fehlende Werte sind mit IC<sub>50</sub>-Werten > 100 μM gleichzusetzen.Tabelle 8-16: Prozentuale Restaktivität der Kinasen unter Zusatz von **22a-d** und **22f-k** [jeweils 10 μM]**22a** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H**22b** R<sup>1</sup> = 4-CF<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H**22c** R<sup>1</sup> = 4-NO<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> = H**22d** R<sup>1</sup> = 2-Br, R<sup>2</sup> = H**22f** R<sup>1</sup> = 4-Br, R<sup>2</sup> = H**22g** R<sup>1</sup> = 4-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sup>2</sup> = H**22h** R<sup>1</sup> = 4-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sup>2</sup> = H**22i** R<sup>1</sup> = 2-Cl, R<sup>2</sup> = H**22j** R<sup>1</sup> = 4-I, R<sup>2</sup> = H**22k** R<sup>1</sup> = 4-CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H

Kinase	22a	22b	22c	22d	22f	22g	22h	22i	22j	22k
<b>AKT1</b>	93	94	78	95	98	96	97	104	99	98
<b>ALK</b>	93	48	38	81	93	84	90	77	95	100
<b>ARK5</b>	108	96	98	101	104	102	104	95	100	108
<b>Aurora B</b>	104	66	56	100	63	85	81	78	55	96
<b>AXL</b>	100	101	72	101	90	101	102	103	100	105
<b>FAK</b>	73	78	67	80	79	78	74	96	79	89
<b>IGF1-R</b>	88	51	33	71	72	73	67	81	78	96
<b>MEK1</b>	119	120	102	107	124	97	105	90	118	63
<b>MET</b>	107	70	34	101	99	100	98	92	87	97
<b>NEK2</b>	106	98	72	106	101	98	104	99	101	99
<b>NEK6</b>	92	97	84	100	105	103	100	111	103	103
<b>PIM1</b>	97	97	78	95	98	101	100	104	90	100
<b>PLK1</b>	108	89	87	104	97	105	108	98	97	100
<b>PRK1</b>	100	82	90	97	88	95	98	93	91	98
<b>SRC</b>	74	40	13	50	74	70	83	51	77	90
<b>VEGF-R2</b>	88	45	17	85	77	74	74	67	66	70

**Tabelle 8-17:** Prozentuale Restaktivität der Kinasen unter Zusatz von **22l-n, r, s** und **22u-y** [jeweils 10 µM]



**22l** R¹ = 4-OCH₃, R² = H

**22m** R¹ = 3,5-di-Cl, R² = H

**22n** R¹ = 3-OCH₃, R² = H

**22r** R¹ = 2-CH₃, R² = H

**22s** R¹ = 2-OCH₃, R² = H

**22u** R¹ = 2-OCH₃, R² = I

**22v** R¹ = 2-Cl, R² = I

**22w** R¹ = 4-CH₃, R² = I

**22x** R¹ = 2-Cl, R² = Phenylethynyl

**22y** R¹ = 4-CH₃, R² = Phenylethynyl

Kinase	<b>22l</b>	<b>22m</b>	<b>22n</b>	<b>22r</b>	<b>22s</b>	<b>22u</b>	<b>22v</b>	<b>22w</b>	<b>22x</b>	<b>22y</b>
<b>AKT1</b>	104	79	92	102	101	88	63	102	60	66
<b>ALK</b>	101	26	95	96	95	89	15	64	12	22
<b>ARK5</b>	102	103	105	102	96	103	85	107	77	86
<b>Aurora B</b>	87	65	109	83	91	71	58	68	72	60
<b>AXL</b>	103	80	104	97	100	99	72	101	75	94
<b>FAK</b>	81	57	79	79	116	83	50	95	55	67
<b>IGF1-R</b>	88	56	86	75	79	87	46	62	49	83
<b>MEK1</b>	109	95	112	104	107	85	91	119	109	114
<b>MET</b>	99	66	107	99	102	87	53	77	49	63
<b>NEK2</b>	103	89	111	98	107	100	79	103	68	98
<b>NEK6</b>	105	81	98	103	103	102	68	107	63	72
<b>PIM1</b>	97	75	90	91	94	95	60	100	58	64
<b>PLK1</b>	100	92	103	92	86	80	86	96	70	73
<b>PRK1</b>	102	94	97	96	90	80	80	105	72	86
<b>SRC</b>	92	49	72	71	76	83	28	50	33	68
<b>VEGF-R2</b>	88	51	87	75	75	65	34	56	32	53

**Tabelle 8-17:** IC<sub>50</sub>-Werte [µM] der Verbindungen **22c, m, v, x** und **y**<sup>a</sup>

Kinase	<b>22c</b>	<b>22m</b>	<b>22v</b>	<b>22x</b>	<b>22y</b>
<b>AKT1</b>	79	40	11	10	34
<b>ALK</b>	12	3.7	1.3	1.0	4.2
<b>ARK5</b>			42	30	
<b>Aurora B</b>	11	27	13	47	23
<b>AXL</b>	39	68	48	16	82
<b>FAK</b>	25	19	7.4	2.5	17

Tabelle 8-17: IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Verbindungen **22c**, **m**, **v**, **x** und **y**<sup>a</sup> (Fortsetzung)

Kinase	22c	22m	22v	22x	22y
<b>IGF1-R</b>	11	8.4	2.5	3.2	
<b>MEK1</b>				82	
<b>MET</b>	23	17	10	3.5	21
<b>NEK2</b>	39	34	24	13	43
<b>NEK6</b>	82	36	25	12	42
<b>PIM1</b>	58	31	17	18	41
<b>PLK1</b>	48		62	79	
<b>PRK1</b>		87	37	38	42
<b>SRC</b>	8.1	6.8	2.4	1.4	26
<b>VEGF-R2</b>	13	18	5.9	1.9	14

<sup>a</sup> Fehlende Werte sind mit IC<sub>50</sub>-Werten > 100 μM gleichzusetzen.

#### 8.4.2 Assay mit GSK-3 und verwandten Kinasen

Strukturen aus der Familie der Paullone stellen potente und selektive Inhibitoren der Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) sowie der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) dar. Daher wurden die Paullon-Derivate **20a** und **21a** von der Arbeitsgruppe um L. Meijer (CNRS, Station Biologique, Roscoff, Frankreich) auf ihre kinaseinhibitorische Aktivität gegenüber CDKs und verwandten Kinasen untersucht.

In einem *in vitro*-Assay wurden die IC<sub>50</sub>-Werte gegenüber der GSK-3 (GSK-3α/β), verschiedenen CDK/Cyclin-Komplexen (CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A, CDK5/p25, CDK9/Cyclin T) und verwandten Kinasen (CK1, DYRK1A, CLK1) bestimmt. Wie unten für das jeweilige Enzym beschrieben wurden die Proteinkinasen exprimiert, isoliert und im Assay eingesetzt.

Unter Verwendung von radioaktiv markiertem [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-ATP wurde die Phosphorylierungsaktivität der Enzyme bestimmt, indem das in ein spezifisches Substrat inkorporierte [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-Phosphat radiometrisch vermessen wurde. Die Verbindungen **20a** und **21a** wurden als Lösung in DMSO (Endkonzentration 1%) eingesetzt. In Dreifachbestimmungen wurde die Restaktivität der jeweiligen Kinase bei neun verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen gemessen. Pro Verdünnungsreihe wurde eine Positivkontrolle ohne Inhibitor und eine Negativkontrolle ohne Enzym angefertigt.

Nach der jeweiligen Subtraktion der Negativkontrolle wurde die Kinaseaktivität prozentual zur maximalen Enzymaktivität (Positivkontrolle) berechnet. Die Substanz-

konzentration wurde in logarithmischer Form gegen die jeweils entsprechende prozentuale Restaktivität aufgetragen und aus den entstanden Dosis-Wirkungs-Kurven die IC<sub>50</sub>-Werte bei 50%iger Aktivität ermittelt.<sup>175</sup>

### CDK1/Cyclin B

CDK1/Cyclin B wurde aus in der *M*-Phase befindlichen Oocyten des Seesterns *Marthasterias glacialis* extrahiert und durch Affinitätschromatographie an p9<sup>CKShs1</sup>-Sepharose-Kügelchen isoliert und gereinigt. Die Elution erfolgte mit freiem p9<sup>CKShs1</sup>.<sup>175</sup> Die Kinaseaktivität wurde in Kinasepuffer C (60 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 15 mM *p*-Nitrophenylphosphat, 25 mM MOPS [3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure] (pH 7.2), 5 mM EGTA, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM Natriumvanadat, 1 mM Phenylphosphat) mit 1 mg/ml Histon H1 als Substrat und 15  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-ATP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml) in einem Gesamtvolumen von 30  $\mu$ l bestimmt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 30 °C wurden 25  $\mu$ l-Aliquots auf Whatman P81 Phosphocellulose-Papier aufgetragen, mit 1%iger Phosphorsäure (v/v) gewaschen und mit einem Szintillationszähler in Gegenwart von 1 ml ACS (Amersham) Szintillationsflüssigkeit vermessen.<sup>176</sup>

### CDK2/Cyclin A

Der CDK2/Cyclin A-Komplex wurde durch Vermischen gleicher Anteile rekombinanter CDK2 und Cyclin A hergestellt. Diese wurden jeweils in mit Baculoviren infizierten SF9-Insektenzellen exprimiert, wobei das Cyclin A mit Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert war. Der Komplex wurde durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose isoliert und gereinigt.<sup>177</sup> Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte analog zu CDK1/Cyclin B.

### CDK5/p25

Der CDK5/p25-Komplex wurde aus gleichen Anteilen rekombinanter Säuger-CDK5 und des Proteins p25 (verkürzte Version von p35, dem 35kDa schweren, regulatorischen Protein der CDK5) hergestellt, die in *E.coli* als GST-Fusionsproteine exprimiert und über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose isoliert worden waren. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte analog zu CDK1/Cyclin B.<sup>175</sup>

### CDK9/Cyclin T

Als humaner, rekombinanter CDK9/Cyclin T-Komplex wurde die Proteinkinase in Baculovirus-infizierten Insektenzellen exprimiert. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte analog zu CDK1/Cyclin B, mit einem pRb-Fragment (Aminosäuren 773-928; 3.5 µg/Assay) als Substrat.<sup>176</sup>

### CK1

CK1 wurde aus homogenisiertem Schweinehirn über Affinitätschromatographie mit an Agarose immobilisiertem GST-Axin isoliert und gereinigt. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte analog zu CDK1/Cyclin B unter Verwendung eines CK1-spezifischen Substrats RRKHAAlGpSAYSITA (Millegen).<sup>176</sup>

### GSK-3 $\alpha/\beta$

GSK-3 $\alpha/\beta$  wurden aus homogenisiertem Schweinehirn über Affinitätschromatographie mit an Agarose immobilisiertem Axin-(His)<sub>6</sub> isoliert und gereinigt.<sup>178</sup> Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte in Kinasepuffer A (pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.5 mg BSA/ml, 5 mM DTT, 25 mM Tris-HCl, 2 µg Heparin/ml) in Gegenwart von 40 µM GS-1 als Substrat und 15 µM [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-ATP in einem Endvolumen von 30 µl. Nach 30-minütiger Inkubation bei 30 °C wurden 25 µl der Lösung auf Whatman P81 Phosphocellulose Papier gegeben, mit 1%iger Phosphorsäure (v/v) gewaschen und mit einem Szintillationszähler in Gegenwart von 1 ml ACS (Amersham) Szintillationsflüssigkeit vermessen.<sup>179</sup>

### *Pf*GSK-3

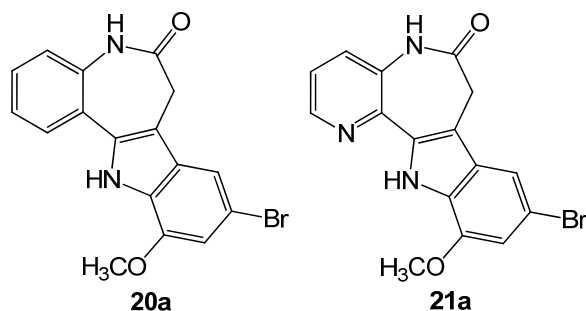
Mit Hilfe eines Vektorplasmids (pBAD/Thio-TOPO, Invitrogen) wurde das *Pf*GSK-3-Gen in E.coli als (His)<sub>6</sub>-tagged Fusionsprotein exprimiert. Nach Extraktion der Proteine aus den Bakterienzellen wurde die rekombinante *Pf*GSK-3 über Affinitätschromatographie mit Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure)-Agarose isoliert und gereinigt. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte analog zu GSK-3 $\alpha/\beta$ .<sup>179</sup>

### DYRK1A

DYRK1A wurde in E.coli als rekombinantes Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein exprimiert und über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose isoliert und

gereinigt. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte analog zu CDK1/Cyclin B, mit basischem Myelinprotein als Substrat.<sup>176</sup>

**Tabelle 8-18:** IC<sub>50</sub>-Werte [μM] der Paullonderivate **20a** und **21a**<sup>a</sup>



Kinase	20a	21a
CDK1/Cyclin B	> 10	> 10
CDK2/Cyclin A	> 10	7
CDK5/p25	> 10/> 10	> 10/> 10
CDK9/Cyclin T	4.90	0.52
CK1	> 10/> 10	> 10/> 10
CLK1	> 10	> 10
GSK-3α/β	7.30/3.30	0.12/0.06
PfGSK-3	> 10	7.00
DYRK1A	> 10	> 10

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub>-Werte aus zwei voneinander unabhängigen Testungen sind durch einen Schrägstrich getrennt.

### 8.4.3 *In vitro*-Tumorzelllinien-Screening (NCI)

Die Verbindungen **15** und **17** wurden im *in vitro cell line screening project* (IVCLSP) des *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, MD, USA) auf ihre antiproliferative Aktivität gegenüber ca. 60 humanen Tumorzelllinien untersucht. Diese Zelllinien können neun verschiedenen Krebsformen oder organspezifischen Tumoren zugeordnet werden. Diese sind Leukämie und Melanome, Darm-, Nieren-, Prostata- und Ovarialtumore sowie nicht kleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC), Brustkrebs und Tumore des zentralen Nervensystems.<sup>152</sup>

Die eingesetzten Tumorzellen wurden in RPMI 1640 Medium, das 5% fetales Kälberserum und 2 mM L-Glutamin enthielt, kultiviert. In einer nach Trypsinisierung erhaltenen Einzelzellsuspension wurde die Zellanzahl bestimmt und die Suspension in der Weise

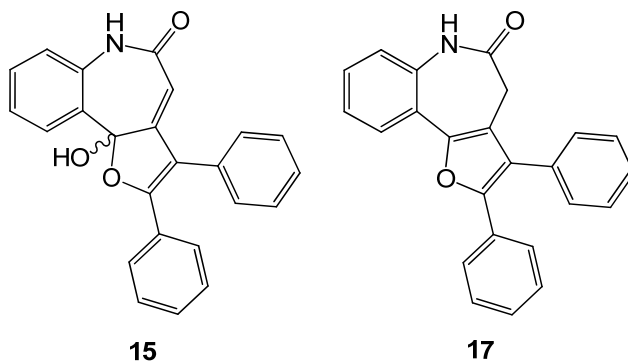
verdünnt, dass Zelldichten von 5,000-40,000 Zellen/100 µl erzielt wurden. Die gewählte Zelldichte hing Zelllinien-spezifisch von der Teilungsrate der Zellen ab. Für das Screening wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten mit 100 µl der jeweiligen Zellsuspension beimpft und für 24 Stunden bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% relativer Luftfeuchtigkeit vorinkubiert.

Die zu testenden Substanzen wurden in DMSO gelöst und mit Medium, das 50 µg/ml Gentamycin zur Verhinderung mikrobieller Kontamination enthielt, zum Zweifachen der zu untersuchenden Konzentration verdünnt. 100 µl-Aliquots der jeweiligen Verdünnung wurden in die Kavitäten appliziert, die bereits 100 µl Medium enthielten, so dass die zu testende Konzentration resultierte. Nach 48-stündiger Inkubation unter den oben genannten Bedingungen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit Trichloressigsäure fixiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Zur spektralphotometrischen Untersuchung der Zellmasse wurde jede Kavität mit einer Lösung von Suforhodamin B inkubiert. Dieser Farbstoff bindet an basische Aminosäurereste von Proteinen, so dass fixierte Zellen angefärbt werden konnten. Nach dem Entfernen ungelösten Farbstoffs wurde der gebundene Anteil mit Tris-Puffer gelöst und bei 515 nm vermessen.<sup>180</sup>

Zunächst erfolgte die Evaluation der Verbindungen **15** und **17** in einem *one dose 60 cell line assay* bei einer Testkonzentration von 10 µM. Das Ergebnis wird als Balkendiagramm (*one dose mean graph*) dargestellt, in dem das prozentuale Wachstum der einzelnen Zelllinien im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (100% Wachstum) aufgeführt ist. Liegt das Zellwachstum behandelter Zellen oberhalb von 100% wurde das Wachstum durch die zugesetzte Substanz induziert. Bei einem Zellwachstum zwischen 0% und 100% wurde eine Wachstumshemmung ausgelöst und unterhalb von 0% wurden Zellen abgetötet. Eine senkrechte Achse im Diagramm beschreibt das mittlere Zellwachstum aller Zelllinien, verglichen mit den jeweiligen Kontrollzellen.

Bei der Verbindung **15** wurde eine signifikante Wachstumsinhibition im *one dose 60 cell line assay* ermittelt, so dass die Substanz anschließend in fünf verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-4}$  -  $10^{-8}$  M) untersucht wurde. Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven konnten die GI<sub>50</sub>-Werte (*growth inhibition 50%*), die TGI-Werte (*total growth inhibition*) und die LC<sub>50</sub>-Werte (*lethal concentration 50%*) als molare Substanzkonzentrationen bestimmt und in Form des negativen dekadischen Logarithmus' angegeben werden. Eine Darstellung dieser Werte erfolgte jeweils als Balkendiagramm (*mean graph*), in dem der Mittelwert (*mean graph midpoint*, MG-MID) eine senkrechte Achse bildet.<sup>153</sup>

**Tabelle 8-19:** Zellwachstum [%] nach Inkubation mit **15** und **17** [10  $\mu$ M];  $\log_{10}$ GI<sub>50</sub>-Werte [M] und GI<sub>50</sub>-Werte [ $\mu$ M] für **15**

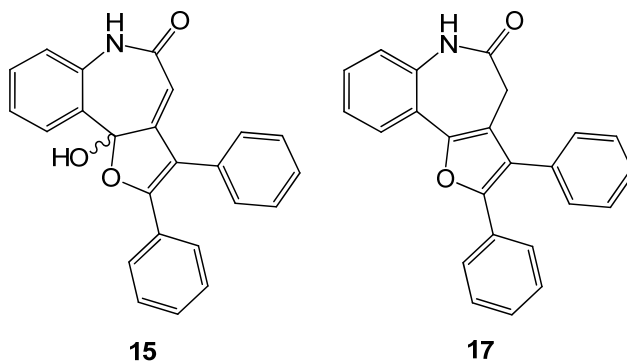


Zelllinie	Zellwachstum [%]		$\log_{10}$ GI <sub>50</sub> -Werte [M]	GI <sub>50</sub> -Werte [ $\mu$ M]
	15	17	15	15
<b>Leukämie</b>				
CCRF-CEM	47.99	80.63	-5.29	5.11
HL-60 (TB)	30.68	91.71	-5.62	2.41
K-562	37.46	96.26	-5.30	5.04
MOLT-4	50.93	65.55	-5.31	4.93
RPMI-8226	29.54	99.05	-5.17	6.79
SR	n. b.	n. b.	-5.46	3.50
<b>NSCLC</b>				
A549/ATCC	51.46	96.02	-5.08	8.24
EKVX	52.59	96.09	-4.94	11.5
HOP-62	51.21	96.91	-4.87	13.5
HOP-92	52.54	99.29	-5.11	7.75
NCI-H226	71.25	97.48	-5.36	4.38
NCI-H23	74.47	84.95	-4.85	14.2
NCI-H322M	67.44	123.18	-4.96	11.0
NCI-H460	24.92	107.05	-5.29	5.12
NCI-H522	66.49	105.48	-4.96	11.0
<b>Darmkrebs</b>				
COLO 205	65.95	126.05	-5.27	5.39
HCC-2998	7.26	80.59	-4.96	11.0
HCT-116	28.98	89.92	-5.38	4.17
HCT-15	29.75	93.48	-5.33	4.71
HT29	33.43	107.61	-5.42	3.79
KM12	47.52	114.29	-5.24	5.74
SW-620	51.95	102.65	-5.05	8.95
<b>Prostatakrebs</b>				
DU-145	33.97	97.91	-5.06	8.74
<b>ZNS-Krebs</b>				
SF-268	71.94	83.74	-4.90	12.6
SF-295	48.96	100.30	-5.35	4.42
SF-539	75.94	91.41	-4.85	14.0
SNB-19	81.13	106.05	-4.87	13.4
SNB-75	53.24	81.28	-5.00	9.93
U251	44.97	94.92	-5.05	9.00

n. b. nicht bestimmt



**Tabelle 8-19:** Zellwachstum [%] nach Inkubation mit **15** und **17** [10  $\mu$ M];  $\log_{10}$ GI<sub>50</sub>-Werte [M] und GI<sub>50</sub>-Werte [ $\mu$ M] für **15** (Fortsetzung)



Zelllinie	Zellwachstum [%]		$\log_{10}$ GI <sub>50</sub> -Werte [M]	GI <sub>50</sub> -Werte [ $\mu$ M]
	15	17	15	15
<b>Melanom</b>				
LOX IMVI	3.02	84.31	-5.46	3.50
MALME-3M	54.75	103.84	-4.82	15.0
M14	n. b.	n. b.	-5.47	3.41
MDA-MB-435	63.81	101.34	-5.33	4.69
SK-MEL-2	70.96	99.99	-4.96	10.9
SK-MEL-28	67.68	110.59	-4.92	11.9
SK-MEL-5	-16.73	103.79	-5.51	3.12
UACC-257	86.17	101.78	-4.76	17.2
UACC-62	45.61	89.61	-5.23	5.95
<b>Ovarial-Krebs</b>				
IGROV1	66.80	101.67	-4.88	13.2
OVCAR-3	62.10	87.36	-4.98	10.5
OVCAR-4	53.10	87.82	-4.99	10.2
OVCAR-5	46.19	83.13	-4.86	13.8
OVCAR-8	72.52	108.17	-4.79	16.1
NCI/ADR-RES	47.09	71.29	-5.01	9.87
SK-OV-3	85.97	112.53	-4.99	10.2
<b>Nierenkrebs</b>				
786-0	24.57	80.84	-5.03	9.28
A498	n. b.	n. b.	-4.98	12.9
ACHN	36.21	90.54	-5.06	8.63
CAKI-1	41.11	87.77	-5.74	1.83
RXF 393	41.30	91.76	-5.39	4.07
SN12C	54.72	97.81	-4.98	10.5
TK-10	57.34	108.81	-4.97	10.7
UO-31	45.47	88.45	-5.00	10.1
<b>Brustkrebs</b>				
MCF7	31.62	89.22	-5.28	5.19
MDA-MB-231/ATCC	46.40	105.50	-4.97	10.7
HS 578T	n. b.	n. b.	-4.81	15.5
BT-549	48.53	100.07	-5.50	3.18
T-47D	54.60	102.30	-5.43	3.72
MDA-MB-468	72.32	112.50	-4.93	11.8
<b>Mittleres Zellwachstum</b>	49.95	96.59	-5.12	

n. b. nicht bestimmt

#### 8.4.4 Untersuchungen zur antiproliferativen Aktivität der Paullonderivate 20a und 21a und der Borkomplexe 22g und 22r

Die antiproliferative Aktivität der Paullonderivate **20a** und **21a** sowie der Borkomplexe **22g** und **22r** wurde gegenüber der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 und der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 (ATCC, USA) bestimmt. Die Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, 4.5 g/l Glukose und L-Glutamin), dem Gentamycin (50 mg/l) zur Verhinderung mikrobieller Kontamination und 10% (v/v) fetales Kälberserum zugesetzt worden waren, kultiviert. Nach dem Spülen mit PBS (*phosphate buffered saline* pH 7.4: 8.0 g NaCl, 1.0 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.15 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.2 g KCl, 0.2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 l H<sub>2</sub>O) wurden die Zellen durch Trypsin-Lösung (0.05% Trypsin und 0.02% EDTA in PBS) abgelöst und in Zellkulturmedium suspendiert. Die Zellanzahl wurde bestimmt und die Suspension zu einer Konzentration von 10,000 Zellen/ml (MCF-7) bzw. 2,500 Zellen/ml (HT-29) verdünnt. In jede Kavität der 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden 100 µl Zellsuspension pipettiert und für 3 Tage (MCF-7) bzw. 2 Tage (HT-29) in feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in einer Konzentration von 100 mM in DMSO gelöst und sechs Verdünnungen (50 mM, 20 mM, 10 mM, 4 mM, 1 mM, 0.2 mM) mit DMSO hergestellt, die anschließend 1:10<sup>3</sup> mit Zellkulturmedium gemischt wurden. Um eine sechsfache Bestimmung jedes Wertes durchzuführen, wurde das Zellkulturmedium von jeweils sechs Kavitäten der Mikrotiterplatte abgesaugt und durch 200 µl des Substanz-enhaltenden Mediums ersetzt. Zur Kontrolle wurden für jede Testung sechs Kavitäten mit 200 µl Medium versetzt, in dem sich DMSO (1:10<sup>3</sup>-Verdünnung mit Medium), aber keine Substanz befand.

Nach 96 (MCF-7) bzw. 72 Stunden (HT-29) wurden die Zellkulturmedien der Mikrotiterplatten abgesaugt und 100 µl verdünnte Glutardialdehyd-Lösung (500 µl, 12.5 ml PBS) zur Fixierung der Zellen zugesetzt. Nach deren Entfernung wurde mit PBS gewaschen und 100 µl Kristallviolett-Lösung (0.02% in H<sub>2</sub>O) zum Anfärben der intakten Zellen zugegeben. Durch anschließendes Waschen wurde ungebundener Farbstoff entfernt. Der gebundene Farbstoffanteil wurde mit 180 µl Ethanol 70% herausgelöst und die Absorption der Einzelkavitäten mit einem Mikroplattenreader bei 590 nm vermessen.

In einer Mikrotiterplatte jeder Zelllinie wurde zeitgleich zur Substanzzugabe mit verdünnter Glutardialdehyd-Lösung das Wachstum der Zellen gestoppt. In diesen

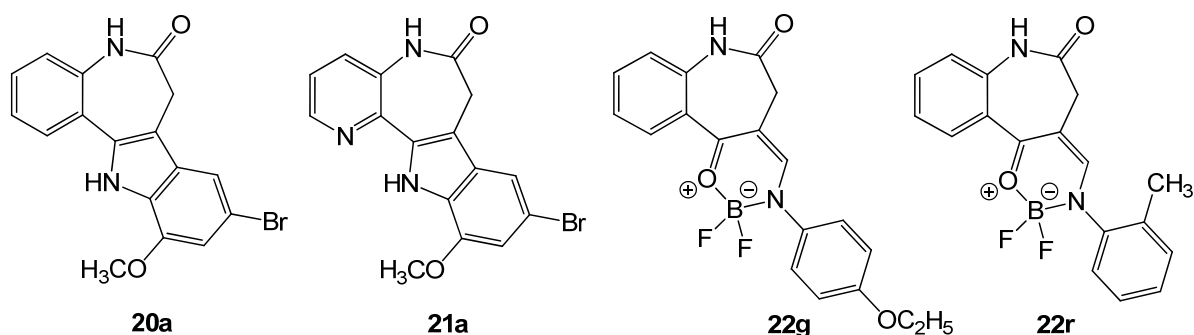
Platten wurde ebenfalls durch Kristallviolett-Färbung die Zellmasse bestimmt und dieser Wert ( $C_0$ -Wert) zur Festlegung der Ausgangszellmasse genutzt.

Zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte wurde zunächst der Mittelwert der sechs Einzelwerte ermittelt. Der Effekt der jeweiligen Substanzkonzentration wurde als prozentuales Wachstum ( $\% \text{ Treated}/\text{Control}_{\text{corr}}$ ) nach der folgenden Gleichung ausgedrückt:

$$T/C_{\text{corr}} [\%] = 100 \cdot (T - C_0) / (C - C_0)$$

Dabei beschreibt  $C_0$  die Zellmasse zum Zeitpunkt der Substanzzugabe,  $C$  die Zellmasse der Kontrollzellen zum Ende des Assays und  $T$  die Zellmasse der mit Substanz behandelten Zellen. Der  $IC_{50}$ -Wert wurde mindestens als Mittelwert aus zwei Messungen und als diejenige Konzentration einer Substanz bestimmt, die eine 50%ige Hemmung der Zellproliferation aufwies.

**Tabelle 8-20:**  $IC_{50}$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ] der Verbindungen **20a**, **21a**, **22g** und **22r** gegenüber MCF-7- und HT-29-Zellen



Zelllinien	<b>20a</b>	<b>21a</b>	<b>22g</b>	<b>22r</b>
<b>MCF-7</b>	n. b.	> 100 (46.1% <sup>a</sup> )	25.5 ± 0.1	60.6 ± 2.3
<b>HT-29</b>	25.7 ± 1.5	38.1 <sup>b</sup>	46.4 ± 7.6	> 100 (49.2% <sup>a</sup> )

n. b.: nicht bestimmt

<sup>a</sup> Prozentuale Inhibition bei maximaler Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ).

<sup>b</sup> Es konnte nur eine Messung ausgewertet werden.

#### 8.4.5 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Verbindungen **22g**, **22r** und **22u** in der HT-29 Zellkultur

Die HT-29-Zellen wurden wie in Kapitel 8.4.4 beschrieben kultiviert und eine Zellsuspension unter Verwendung von phenolrotfreiem DMEM hergestellt. Die Suspension wurde zu einer Konzentration von 3000 HT-29-Zellen/ml verdünnt. In die mittleren

acht Kavitäten der 24-Loch-Glasbodenschalen wurden je 500 µl Zellsuspension pipetiert und für 5 Tage in feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Verbindungen **22r** und **22u** wurden in einer Konzentration von 50 mM sowie **22g** in einer Konzentration von 20 µM in DMSO gelöst. Die Lösungen wurden 1:10<sup>3</sup> mit phenolrotfreiem Zellkulturmedium verdünnt. Nach dem Entfernen des Mediums aus den Kavitäten der Glasbodenschale wurden jeweils 500 µl des Substanz-enthaltenden Mediums zugegeben (**22g**: 20 µM; **22r/22u**: jeweils 50 µM) und für 10 Stunden unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert. Gleichermaßen wurde mit zwei Kavitäten verfahren, die als Kontrolle zur Bestimmung des Fluoreszenzhintergrundes mit Substanz-freiem Medium versetzt worden waren. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Substanz-enthaltende Medium entfernt und durch 500 µl frisches phenolrotfreies Medium ersetzt.

Mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops (Nikon A1) wurden die Proben untersucht. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm und eine emittierte Strahlung wurde zwischen 500 und 550 nm (**22g** und **22u**) bzw. zwischen 464 und 499 nm (**22r**) registriert. Aus der emittierten Fluoreszenzstrahlung wurde eine Abbildung erzeugt, deren Farbe willkürlich gewählt wurde. Ohne Positionsveränderung der Probe wurde von demselben Ausschnitt der Kavität eine DIC (*Differential Interference Contrast*)-Aufnahme zur Darstellung der Zellen angefertigt. Beide erzielten Darstellungen sind in einer Abbildung übereinandergelegt, um die detektierte Fluoreszenzstrahlung spezifischen Zellbereichen zuordnen zu können. Die unter den gleichen Bedingungen untersuchten Zellen in den Kontrollkavitäten ergaben eine überaus geringe, nicht lokalisierte Hintergrundfluoreszenz.

#### 8.4.6 Durchführung der molekularen Dockingstudien

Die Docking-Experimente zur Untersuchung des potentiellen Bindungsmodus' des Paullonderivates **21a** in GSK-3β sowie der Diphenylfuranverbindung **17** in Aurora A, IGF-1R und SRC wurden von Dr. Lutz Preu, Institut für Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig, durchgeführt. Eingesetzt wurde das Docking-Programm ArgusLab 4.0.1 (Mark A. Thompson, Planaria Software LLC, Seattle, WA, USA).<sup>140,181</sup>

Für das Docking des Paullonderivates **21a** in die Bindetasche der GSK-3β wurde die Kristallstruktur genutzt, die als Cokristallisat mit Alsterpaullon vorliegt (PDB ID: 1q3w).<sup>15</sup> Das Furanderivat **17** sollte in die Bindetasche der Aurora A gedockt werden, basierend auf einer Kristallstruktur, die mit einem Furanopyrimidinderivat von Coumar et al.

cokristallisiert wurde (PDB ID: 3k5u).<sup>78</sup> Da die Docking-Studien vor Veröffentlichung der Kristallstruktur erfolgten, wurde eine Aurora A-Kristallstruktur genutzt, die ein Pyrazol-derivat aus einer früheren Untersuchung der Arbeitsgruppe in der Bindetasche aufweist (PDB ID: 3fdn).<sup>135</sup> Für das Docking mit IGF-1R wurde die Kristallstruktur 2zm3 verwendet, für SRC die Struktur 2bdf eingesetzt.<sup>136-137</sup>

Die Verbindungen wurden mit Hilfe des Programms HyperChem 8.0.4 (Hypercube Inc., Gainesville, Florida, USA) mit dem implementierten MM+ Kraftfeld auf einen RMS Gradienten von 0.1 kcal/Å x mol energieminiert.<sup>182</sup>

Für das Docking wurde hauptsächlich GADock, ein genetischer Algorithmus als *docking engine* eingesetzt. Die folgenden Parametereinstellungen wurden genutzt: *no grids*; *Ligand*: flexible; *Population size*: 100; *max. Generations*: 1000; *Mutation rate*: 0.8; *Crossover rate*: 0.8; *Elitism*: 5. Mit Hilfe der in ArgusLab enthaltenen Scoring-Funktion *AScore* wurden die ermittelten Docking-Posen bewertet.

Die Visualisierung der erzielten Docking-Posen erfolgte mit UCSF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, SF, USA).<sup>16</sup>

Der verwendete Docking-Algorithmus wurde mit Hilfe eines Redocking-Versuchs validiert. Der ursprüngliche Ligand der jeweiligen Kristallstruktur wurde mit der Option „rigid“ in die Bindetasche gedockt. Die Grenze für den RMSD-Wert lag bei 1.50 Å.

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] Kudinova, N. V., Berezov, T. T.: Photodynamic therapy of cancer: Search for ideal photosensitizer. *Biochem. Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.* **2010**, 4, 95-103.
- [2] Johnson, L. N.: Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. *Q. Rev. Biophys.* **2009**, 42, 1-40.
- [3] Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M., Roth, H. J.: *Medizinische Chemie*. 1. Aufl., **2005**, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 461-502.
- [4] Sielecki, T. M., Boylan, J. F., Benfield, P. A., Trainor, G. L.: Cyclin-dependent kinase inhibitors: Useful targets in cell cycle regulation. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1-18.
- [5] Eglen, R. M., Reisine, T.: The current status of drug discovery against the human kinome. *Assay Drug Dev. Technol.* **2009**, 7, 22-43.
- [6] Hopkins, A. L., Groom, C. R.: The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discovery.* **2002**, 1, 727-730.
- [7] Morphy, R.: Selectively nonselective kinase inhibition: Striking the right balance. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 1413-1437.
- [8] Grant, S. K.: Therapeutic protein kinase inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 1163-1177.
- [9] Ventura, J.-J., Nebreda, A. R.: Protein kinases and phosphatases as therapeutic targets in cancer. *Clin. Transl. Oncol.* **2006**, 8, 153-160.
- [10] Cowan-Jacob, S. W.: Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63, 2608-2625.
- [11] Blume-Jensen, P., Hunter, T.: Oncogenic kinase signalling. *Nature.* **2001**, 411, 355-365.
- [12] Vulpetti, A., Bosotti, R.: Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Il Farmaco.* **2004**, 59, 759-765.
- [13] Scapin, G.: Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors. *Drug Discov. Today.* **2002**, 7, 601-611.
- [14] Hubbard, S. R.: Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* **2004**, 5, 464-470.
- [15] Bertrand, J. A., Thieffine, S., Vulpetti, A., Cristiani, C., Valsasina, B., Knapp, S., Kalisz, H. M., Flocco, M.: Structural characterization of the GSK-3 $\beta$  active site using selective and non-selective ATP-mimetic inhibitors. *J. Mol. Biol.* **2003**, 333, 393-407.

- 
- [16] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E.: UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605-1612.
- [17] Liao, J. J.-L.: Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 409-424.
- [18] Ghose, A. K., Herbertz, T., Pippin, D. A., Salvino, J. M., Mallamo, J. P.: Knowledge based prediction of ligand binding modes and rational inhibitor design for kinase drug discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5149-5171.
- [19] Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G., Gerok, W.: *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 15. Aufl., **2005**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 119-184.
- [20] Garnett, M. J., Marais, R.: Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. *Cancer Cell.* **2004**, 6, 313-319.
- [21] Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W. N., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabrilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J. L., Radich, J. P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L., Larson, R. A.: Five-year follow-up of patients receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2006**, 355, 2408-2417.
- [22] Geiger, T. R., Peeper, D. S.: Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis. *Cancer Res.* **2007**, 67, 6221-6229.
- [23] Roodink, I., Leenders, W. P. J.: Targeted therapies of cancer: Angiogenesis inhibition seems not enough. *Cancer Lett.* **2010**, 299, 1-10.
- [24] Bayne, E. H., Allshire, R. C.: RNA-directed transcriptional gene silencing in mammals. *Trends Genet.* **2005**, 21, 370-373.
- [25] Kaiser, P. K., Symons, R. C. A., Shah, S. M., Quinlan, E. J., Tabandeh, H., Do, D. V., Reisen, G., Lockridge, J. A., Short, B., Guercioli, R., Nguyen, Q. D.: RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027. *Am. J. Ophthalmol.* **2010**, 150, 33-39.
- [26] Oh, Y.-K., Park, T. G.: siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, 61, 850-862.
- [27] Rayburn, E. R., Zhang, R.: Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: Mission possible or impossible? *Drug Discov. Today.* **2008**, 13, 513-521.
- [28] Li, J., Zhu, Z.: Research and development of next generation of antibody-based therapeutics. *Acta Pharmacol. Sin.* **2010**, 31, 1198-1207.

- [29] Adams, G. P., Weiner, L. M.: Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 1147-1157.
- [30] Riely, G. J., Miller, V. A.: Vascular endothelial growth factor trap in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 4623-4627.
- [31] Spiridonova, V. A.: Molecular recognition elements: DNA/RNA-aptamers to proteins. *Biochemistry (Moscow)*. **2010**, 4, 138-149.
- [32] Bunka, D. H. J., Platonova, O., Stockley, P. G.: Development of aptamer therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, 10, 557-562.
- [33] An, X., Tiwari, A. K., Sun, Y., Ding, P.-R., Ashby Jr., C. R., Chen, Z.-S.: BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. *Leuk. Res.* **2010**, 34, 1255-1268.
- [34] Amato, A.: Colorectal gastrointestinal stromal tumor. *Tech. Coloproctol.* **2010**, 1-5.
- [35] McArthur, G. A., Demetri, G. D., van Oosterom, A., Heinrich, M. C., Debiec-Rychter, M., Corless, C. L., Nikolova, Z., Dimitrijevic, S., Fletcher, J. A.: Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib: Imatinib target exploration consortium study B2225. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 866-873.
- [36] Manley, P. W., Stiefl, N., Cowan-Jacob, S. W., Kaufman, S., Mestan, J., Wartmann, M., Wiesmann, M., Woodman, R., Gallagher, N.: Structural resemblances and comparisons of the relative pharmacological properties of imatinib and nilotinib. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 6977-6986.
- [37] Stinchcombe, T. E., Socinski, M. A.: Gefitinib in advanced non-small cell lung cancer: Does it deserve a second chance? *The Oncologist.* **2008**, 13, 933-944.
- [38] Laack, E., Sauter, G., Bokemeyer, C.: Lessons learnt from gefitinib and erlotinib: Key insights into small-molecule EGFR-targeted kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* **2010**, 69, 259-264.
- [39] Siebenand, S.: Gefitinib gegen Lungenkrebs. *Pharm. Ztg.* **2009**, 154, 3344-3345.
- [40] FDA: Center for drug evaluation and research, [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2010/021743s14s16lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021743s14s16lbl.pdf), abgerufen am 15.11.2010.
- [41] Chowdhury, S., Pickering, L. M., Ellis, P. A.: Lapatinib: A novel dual tyrosine kinase inhibitor. *Targ. Oncol.* **2007**, 2, 107-112.
- [42] FDA: Center for drug evaluation and research, <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm203522.htm>, abgerufen am 15.11.2010.



- 
- [43] Inamdar, G. S., Madhunapantula, S. V., Robertson, G. P.: Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, 80, 624-637.
- [44] Dalglish, A., Copier, J.: New multitargeted treatments with antiangiogenic and antitumor activity: focus on sunitinib. *Targ. Oncol.* **2007**, 2, 17-29.
- [45] Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R. A., Schwartz, B., Simantov, R., Kelley, S.: Discovery and development of sorafenib: A multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery.* **2006**, 5, 835-844.
- [46] Becker, C.: Krebstherapie: Sorafenib greift von zwei Seiten an. *Pharm. Ztg.* **2005**, 150, 3984-3985.
- [47] Huynh, H.: Molecularly targeted therapy in hepatocellular carcinoma. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, 80, 550-560.
- [48] Goodman, V. L., Rock, E. P., Dagher, R., Ramchandani, R. P., Abraham, S., Gobburu, J. V. S., Booth, B. R., Verbois, S. L., Morse, D. E., Liang, C. Y., Chidambaram, N., Jiang, J. X., Tang, S., Mahjoob, K., Justice, R., Pazdur, R.: Approval summary: Sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 1367-1373.
- [49] EMEA: Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht Sutent, [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000687/WC500057689.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000687/WC500057689.pdf), abgerufen am 22.11.2010.
- [50] Cowey, C. L., Sonpavde, G., Hutson, T. E.: New advancements and developments in treatment of renal cell carcinoma: focus on pazopanib. *Oncotargets Therapy.* **2010**, 3, 147-155.
- [51] Lang, J. M., Harrison, M. R.: Pazopanib for the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin. Med. Oncol.* **2010**, 4, 95-105.
- [52] EMEA: Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht Votrient, [http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/001141/WC500094273.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/001141/WC500094273.pdf), abgerufen am 22.11.2010.
- [53] Romano, G.: An overview on the cyclin-dependent kinase 9-related pathway. *Drugs Future.* **2010**, 35, 59-66.
- [54] Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Leost, M., Senderowicz, A. M., Lahusen, T., Kunick, C., Meijer, L., Sausville, E. A.: Discovery and initial characterization of the Paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res.* **1999**, 59, 2566-2569.

- [55] Kunick, C., Lauenroth, K., Leost, M., Meijer, L., Lemcke, T.: 1-Azakenpaullone is a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 413-416.
- [56] Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y.-Z., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Kunick, C., Meijer, L.: Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 5983-5994.
- [57] Lahusen, T., De Siervi, A., Kunick, C., Senderowicz, A. M.: Alsterpaullone, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, induces apoptosis by activation of caspase-9 due to perturbation in mitochondrial membrane potential. *Mol. Carcinog.* **2003**, 36, 183-194.
- [58] Schultz, C., Link, A., Leost, M., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Sausville, E. A., Meijer, L., Kunick, C.: Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, evaluation of CDK1/Cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2909-2919.
- [59] Knockaert, M., Wieking, K., Schmitt, S., Leost, M., Grant, K. M., Mottram, J. C., Kunick, C., Meijer, L.: Intracellular targets of paullones. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 25493-25501.
- [60] Tolle, N., Kunick, C.: Paullones as inhibitors of protein kinases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, angenommen.
- [61] Glauner, H., Ruttekolk, I. R., Hansen, K., Steemers, B., Chung, Y.-D., Becker, F., Hannus, S., Brock, R.: Simultaneous detection of intracellular target and off-target binding of small molecule cancer drugs at nanomolar concentrations. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, 160, 958-970.
- [62] Prinz, A., Diskar, M., Herberg, F. W.: Application of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for biomolecular interaction studies. *ChemBioChem.* **2006**, 7, 1007-1012.
- [63] Chaurand, P., Schwartz, S. A., Reyzer, M. L., Caprioli, R. M.: Imaging mass spectrometry: Principles and potentials. *Toxicol. Pathol.* **2005**, 33, 92-101.
- [64] Signor, L., Varesio, E., Staack, R. F., Starke, V., Richter, W. F., Hopfgartner, G.: Analysis of erlotinib and its metabolites in rat tissue sections by MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2007**, 42, 900-909.
- [65] Lasch, P., Naumann, D.: Spatial resolution in infrared microspectroscopy imaging of tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* **2006**, 1758, 814-829.
- [66] Stumpf, W. E.: Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **2005**, 51, 25-40.

- [67] Lang, P., Yeow, K., Nichols, A., Scheer, A.: Cellular imaging in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 343-356.
- [68] Lankelma, J., Dekker, H., Luque, R. F., Luykx, S., Hoekman, K., van der Valk, P., van Diest, P. J., Pinedo, H. M.: Doxorubicin gradients in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 1703-1707.
- [69] Paddock, S. W.: Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Mol. Biotechnol.* **2000**, 16, 127-149.
- [70] Shaner, N. C., Steinbach, P. A., Tsien, R. Y.: A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods.* **2005**, 2, 905-909.
- [71] Lakowicz, J. R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2. Aufl., **1999**, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 1-23.
- [72] Loudet, A., Burgess, K.: BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4891-4932.
- [73] Zheng, Q., Xu, G., Prasad, P. N.: Conformationally restricted dipyrromethene boron difluoride (BODIPY) dyes: Fluorescent, multicolored probes for cellular imaging. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 5812-5819.
- [74] Xia, M., Wu, B., Xiang, G.: Synthesis, structure and spectral study of two types of novel fluorescent BF<sub>2</sub> complexes with heterocyclic 1,3-enaminoketone ligands. *J. Fluorine Chem.* **2008**, 129, 402-408.
- [75] Robertson, C. A., Hawkins-Evans, D., Abrahamse, H.: Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol., B.* **2009**, 96, 1-8.
- [76] Lim, S. H., Thivierge, C., Nowak-Sliwinska, P., Han, J., van den Bergh, H., Wagnières, G., Burgess, K., Lee, H. B.: In vitro and in vivo photocytotoxicity of boron dipyrromethene derivatives for photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2865-2874.
- [77] Stukenbrock, H.: Design und Synthese neuartiger GSK-3-Inhibitoren: Wirkstoffe zur Protektion und Proliferationsstimulation pankreatischer  $\beta$ -Zellen. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig, **2008**.
- [78] Coumar, M. S., Tsai, M.-T., Chu, C.-Y., Uang, B.-J., Lin, W.-H., Chang, C.-Y., Chang, T.-Y., Leou, J.-S., Teng, C.-H., Wu, J.-S., Fang, M.-Y., Chen, C.-H., Hsu, J. T.-A., Wu, S.-Y., Chao, Y.-S., Hsieh, H.-P.: Identification, SAR studies, and x-ray co-crystallographic analysis of a novel furanopyrimidine Aurora kinase A inhibitor. *ChemMedChem.* **2010**, 5, 255-267.
- [79] Schultz, C.: Antitumoraktive [d]-anellierte [1]Benzazepin-2-one. *Dissertation*, Universität Hamburg, **1999**.

- [80] Kunick, C.: Synthese von 7,12-Dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6-(5*H*)onen und 6,11-Dihydro-thieno-[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5(4*H*)-on. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)*. **1992**, 325, 297-299.
- [81] Link, A.: Antitumoraktive Pyrido[3,2-*d*]-1-benzazepine. *Dissertation*, Universität Hamburg, **1996**.
- [82] Lauenroth, K.: Paullonderivate mit veränderter heterozyklischer Grundstruktur als Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen. *Dissertation*, Universität Hamburg, **2001**.
- [83] Mosterd, A., Matser, H. J., Bos, H. J. T.: Photoaddition of non-cisoid 1,2-diketones and phenylglyoxal to alkylthioacetylenes; preparation of 3-alkylthiofurans. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 48, 4179-4180.
- [84] Wolter, M., Nordmann, G., Job, G. E., Buchwald, S. L.: Copper-catalyzed coupling of aryl iodides with aliphatic alcohols. *Org. Lett.* **2002**, 4, 973-976.
- [85] Kappe, C. O.: Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 6250-6284.
- [86] Kohn, M.: Bromination of *o*-acetanisidide, *o*-anisidine, and a molecular rearrangement in the bromination of 4,5-dibromo-*o*-anisidine. *J. Org. Chem.* **1953**, 18, 530-533.
- [87] Fuchs, W.: Bromination of aromatic amines. *Monatsh. Chem.* **1914**, 36, 113-141.
- [88] Kerwin, S. M.: ChemBioOffice Ultra 2010 Suite. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2466-2467.
- [89] Becker, H. G. O., Berger, W., Domschke, G., Fanghänel, E., Faust, J., Fischer, M., Gentz, F., Gewalt, K., Gluch, R., Mayer, R., Müller, K., Pavel, D., Schmidt, H., Schollberg, K., Schwetlilck, K., Seiler, E., Zeppenfeld, G.: *Organikum*. 21. Aufl., **2001**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 630-639.
- [90] Enders, E.: *Methoden zur Herstellung und Umwandlung von Arylhydrazinen und Arylhydrazonen*. In: Stroh, R. (Hrsg.), *Stickstoffverbindungen* 1. Band 10/2. In: Müller, E. (Hrsg.), *Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl)*, 4. Aufl., **1967**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 201-217.
- [91] Hunsberger, I. M., Shaw, E. R., Fugger, J., Ketcham, R., Lednicer, D.: The preparation of substituted hydrazines. IV. Arylhydrazines via conventional methods. *J. Org. Chem.* **1955**, 21, 394-399.
- [92] Muetterties, E. L.: General introduction to boron chemistry. In: *The chemistry of boron and its compounds*. Muetterties, E. L., 1. Aufl., **1967**, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1-24.
- [93] Elschenbroich, C.: *Organometallchemie*. 6. Aufl., **2008**, B. G. Teubner Verlag/GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden, 96-107.

- [94] Dunkel, U.: Die Sonogashira-Reaktion zur Synthese von alkylierten 1-Benzazepin-2-onen - Darstellung und biologische Aktivität neuer Kinase-Inhibitoren. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig, **2007**.
- [95] Gerasov, A. O., Shandura, M. P., Kovtun, Y. P., Vlasenko, Y. G., Gorchev, V. F.: 1,3,2-(2*H*)-Dioxaborine polymethine dyes on the base of dehydroacetic acid - effective fluorescent amine probes. *J. Heterocyclic Chem.* **2008**, 45, 1665-1672.
- [96] Matichak, J. D., Hales, J. M., Ohira, S., Barlow, S., Jang, S.-H., Jen, A. K.-Y., Brédas, J.-L., Perry, J. W., Marder, S. R.: Using end groups to tune the linear and nonlinear optical properties of bis(dioxaborine)-terminated polymethine dyes. *ChemPhysChem*. **2010**, 11, 130-138.
- [97] Macedo, F. P., Gwengo, C., Lindeman, S. V., Smith, M. D., Gardinier, J. R.:  $\beta$ -Diketonate,  $\beta$ -ketoiminate, and  $\beta$ -diiminate complexes of difluoroboron. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 3200-3211.
- [98] Klappa, J. J., Geers, S. A., Schmidtke, S. J., MacManus-Spencer, L. A., McNeill, K.: Pyridylpyrrolides as alternatives to cyclometalated phenylpyridine ligands: synthesis and characterization of luminescent zinc and boron pyridylpyrrolide complexes. *J. Chem. Soc.* **2004**, 6, 883-891.
- [99] Zhou, Y., Xiao, Y., Chi, S., Qian, X.: Isomeric boron-fluorine complexes with donor-acceptor architecture: Strong solid/liquid fluorescence and large stokes shift. *Org. Lett.* **2008**, 10, 633-636.
- [100] Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 7. Aufl., **2005**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 74-89.
- [101] Hermanek, S.:  $^{11}\text{B}$  NMR spectra of boranes, main-group heteroboranes, and substituted derivatives. Factors influencing chemical shifts of skeletal atoms. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 325-362.
- [102] Glusker, J. P., Lewis, M., Rossi, M.: *Crystal structure analysis for chemists and biologists*. 1. Aufl., **1994**, VCH Publishers, New York, 1-32.
- [103] Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G.: Tables of bond lengths determined by x-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*. **1987**, 1-19.
- [104] Dilman, A. D., Arkhipov, D. E., Levin, V. V., Belyakov, P. A., Korlyukov, A. A., Struchkova, M. I., Tartakovsky, V. A.: Trifluormethylation of salicyl aldimines. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8604-8607.
- [105] Riddle, J. A., Lathrop, S. P., Bollinger, J. C., Lee, D.: Schiff base route to stackable *pseudo*-triphenylenes: stereoelectronic control of assembly and luminescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10986-10987.
- [106] Itoh, K., Fujimoto, M., Hashimoto, M.: 1-Difluoroboronyloxy-3-(*N*-methylimino)-1-phenyl-1-butene and its two photoproducts. *Acta. Cryst.* **1998**, C54, 1324-1327.

- [107] Itoh, K., Fujimoto, M., Hashimoto, M.: Photodimerization of enaminketonatoboron difluorides. *New J. Chem.* **2002**, 26, 1070-1075.
- [108] Strzelczyk, W., Sobieszczky, P., Palusiak, M.: Bonding in  $\beta$ -diketiminatate boron and its analogues. *Struct. Chem.* **2009**, 20, 919-923.
- [109] Malecka, M.: Intramolecular N-H...O resonance-assisted hydrogen bonds in crystal structures of oxaphosphinanes and chromones - DFT calculations and AIM analysis. *J. Mol. Struct.* **2007**, 831, 135-143.
- [110] Krygowski, T. M., Zachara-Horeglad, J. E., Palusiak, M.: H-bonding-assisted substituent effect. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 4944-4949.
- [111] Sobczyk, L., Grabowski, S. J., Krygowski, T. M.: Interrelation between H-bond and  $\pi$ -electron delocalization. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 3513-3560.
- [112] Beier, T., Häffner, H., Hermanspahn, N., Karshenboim, S. G., Kluge, H.-J., Quint, W., Stahl, S., Verdú, J., Werth, G.: New determination of the electron's mass. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 88, 116031-116034.
- [113] Goze, C., Ulrich, G., Mallon, L. J., Allen, B. D., Harriman, A., Ziessel, R.: Synthesis and photophysical properties of borondipyrromethene dyes bearing aryl substituents at the boron center. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10231-10239.
- [114] Ulrich, G., Goze, C., Goeb, S., Retaillieu, P., Ziessel, R.: New fluorescent aryl- or ethynylaryl-boron-substituted indacenes as promising dyes. *New. J. Chem.* **2006**, 30, 982-986.
- [115] Becker, H. G. O., Berger, W., Domschke, G., Fanghänel, E., Faust, J., Fischer, M., Gentz, F., Gewalt, K., Gluch, R., Mayer, R., Müller, K., Pavel, D., Schmidt, H., Schollberg, K., Schwetlilck, K., Seiler, E., Zeppenfeld, G.: *Organikum*. 21. Aufl., **2001**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 557-566.
- [116] Liu, S.-F., Wu, Q., Schmider, H. L., Aziz, H., Hu, N.-X., Popović, Z., Wang, S.: Syntheses, structures, and electroluminescence of new blue/green luminescent chelate compounds:  $\text{Zn}(\text{2-py-in})_2(\text{THF})$ ,  $\text{BPh}_2(\text{2-py-in})$ ,  $\text{Be}(\text{2-py-in})_2$ , and  $\text{BPh}_2(\text{2-py-aza})$ . *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3671-3678.
- [117] Liu, Q., Mudadu, M. S., Thummel, R., Tao, Y., Wang, S.: From blue to red: Syntheses, structures, electronic and electroluminescent properties of tunable luminescent N,N chelate boron complexes. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, 15, 143-154.
- [118] Esparza-Ruiz, A., Peña-Hueso, A., Nöth, H., Flores-Parra, A.: Boron coordination compounds derived from 2-phenyl-benzimidazole and 2-phenyl-benzotriazole bidentate ligands. *J. Organomet. Chem.* **2009**, 694, 3814-3822.
- [119] Heard, P. J.: Dynamic stereochemical rearrangements in chiral organometallic complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 36, 551-569.

- [120] Tahtaoui, C., Thomas, C., Rohmer, F., Klotz, P., Duportail, G., Mély, Y., Bonnet, D., Hibert, M.: Convenient method to access new 4,4-dialkoxy- and 4,4-diaryloxy-diaza-s-indacene dyes: Synthesis and spectroscopic evaluation. *J. Org. Chem.* **2007**, 269-272.
- [121] Schmidt, W.: *Optische Spektroskopie*. 2. Aufl., **2000**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 13-61.
- [122] Gottwald, W., Heinrich, K. H.: *UV/VIS-Spektroskopie für Anwender*. 1. Aufl., **1998**, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim, 7-50.
- [123] Skoog, D. A., Leary, J. J.: *Principles of instrumental analysis*. 4. Aufl., **1992**, Saunders College Publishing, Orlando, Florida, 150-195.
- [124] Görög, S.: *Ultraviolet-visible spectrophotometry in pharmaceutical analysis*. 1. Aufl., **1995**, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 7-92.
- [125] Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Vyvyan, J. R.: *Introduction to spectroscopy*. 4. Aufl., **2009**, Brooks/Cole, Belmont, 386-387.
- [126] Schmidt, W.: *Optische Spektroskopie*. 2. Aufl., **2000**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 123-131.
- [127] Schmidt, W.: *Optische Spektroskopie*. 2. Aufl., **2000**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 191-212.
- [128] Becker, H. G. O., Berger, W., Domschke, G., Fanghänel, E., Faust, J., Fischer, M., Gentz, F., Gewalt, K., Gluch, R., Mayer, R., Müller, K., Pavel, D., Schmidt, H., Schollberg, K., Schwetlilck, K., Seiler, E., Zeppenfeld, G.: *Organikum*. 21. Aufl., **2001**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 159-166.
- [129] Lakowicz, J. R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2. Aufl., **1999**, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 52-53.
- [130] HORIBA Jobin Yvon Ltd., D. G., Stanmore Middlesex HA7 1BQ, United Kingdom ([www.horiba.co.uk](http://www.horiba.co.uk)): Application note: A guide to recording fluorescence quantum yields - Stand Oktober 2010.
- [131] Eaton, D. F.: Reference materials for fluorescence measurement. *J. Photochem. Photobiol., B* **1988**, 2, 523-531.
- [132] Rhys Williams, A. T., Winfield, S. A., Miller, J. N.: Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst*. **1983**, 108, 1067-1071.
- [133] Frame, S., Cohen, P.: GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **2001**, 359, 1-16.

- [134] Miyata, Y., Nishida, E.: Distantly related cousins of MAP kinase: Biochemical properties and possible physiological functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 266, 291-295.
- [135] Coumar, M. S., Leou, J.-S., Shukla, P., Wu, J.-S., Dixit, A. K., Lin, W.-H., Chang, C.-Y., Lien, T.-W., Tan, U.-K., Chen, C.-H., Hsu, J. T.-A., Chao, Y.-S., Wu, S.-Y., Hsieh, H.-P.: Structure-based drug design of novel Aurora kinase A inhibitors: Structural basis for potency and specificity. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 1050-1062.
- [136] Mayer, S. C., Banker, A. L., Boschelli, F., Di, L., Johnson, M., Kenny, C. H., Krishnamurthy, G., Kutterer, K., Moy, F., Petusky, S., Ravi, M., Tkach, D., Tsou, H.-R., Xu, W.: Lead identification to generate isoquinolinedione inhibitors of insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) for potential use in cancer treatment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 3641-3645.
- [137] Dagarno, D., Stehle, T., Narula, S., Schelling, P., van Schravendijk, M. R., Adams, S., Andrade, L., Keats, J., Ram, M., Jin, L., Grossman, T., MacNeil, I., Metcalf III, C., Shakespeare, W., Wang, Y., Keenan, T., Sundaramoorthi, R., Bohacek, R., Weigle, M., Sawyer, T.: Structural basis of Src tyrosine kinase inhibition with a new class of potent and selective trisubstituted purine-based compounds. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, 67, 46-57.
- [138] Foloppe, N., Fisher, L. M., Howes, R., Kierstan, P., Potter, A., Robertson, A. G. S., Surgenor, A. E.: Structure-based design of novel Chk1 inhibitors: Insights into hydrogen bonding and protein-ligand affinity. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4332-4345.
- [139] RCSB Protein Data Bank; <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>.
- [140] ArgusLab 4.0.1, Mark A. Thompson, Planaria Software LLC, Seattle, WA, <http://www.arguslab.com>.
- [141] Mills, J. E. J., Dean, P. M.: Three-dimensional hydrogen-bond geometry and probability information from a crystal survey. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1996**, 10, 607-622.
- [142] Wu, J.-S., Li, W., Craddock, B. P., Foreman, K. W., Mulvihill, M. J., Ji, Q.-S., Miller, W. T., Hubbard, S. R.: Small-molecule inhibition and activation-loop *trans*-phosphorylation of the IGF1 receptor. *EMBO J.* **2008**, 27, 1985-1994.
- [143] Vader, G., Lens, S. M. A.: The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, 1786, 60-72.
- [144] Katayama, H., Brinkley, W. R., Sen, S.: The Aurora kinases: Role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, 22, 451-464.
- [145] Kitzen, J. J. E. M., de Jonge, M. J. A., Verweij, J.: Aurora kinase inhibitors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2010**, 73, 99-110.
- [146] Fu, J., Bian, M., Jiang, Q., Zhang, C.: Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol. Cancer. Res.* **2007**, 5, 1-10.



- [147] Heller, G., Zöchbauer-Müller, S.: Insulin-like growth factor type I receptor: A new target in the treatment of non-small cell lung cancer patients. *Memo.* **2010**, 3, 81-84.
- [148] Li, R., Pourpak, A., Morris, S. W.: Inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) tyrosine kinase as a novel cancer therapy approach. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 4981-5004.
- [149] Wheeler, D. L., Iida, M., Dunn, E. F.: The role of src in solid tumors. *The Oncologist.* **2009**, 14, 667-678.
- [150] Dempke, W., Zippel, R.: Src-Kinasen in der Tumorthherapie. *Med. Klin.* **2010**, 105, 711-715.
- [151] Kim, L. C., Song, L., Haura, E. B.: Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2009**, 6, 587-595.
- [152] Shoemaker, R. H.: The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer.* **2006**, 6, 813-823.
- [153] Boyd, M. R., Paull, K. D.: Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.* **1995**, 34, 91-109.
- [154] Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S. C., Alessi, D. R., Cohen, P.: The selectivity of protein kinase inhibitors: A further update. *Biochem. J.* **2007**, 408, 297-315.
- [155] Meijer, L., Flajolet, M., Greengard, P.: Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, 25, 471-480.
- [156] Forde, J. E., Dale, T. C.: Glycogen synthase kinase 3: A key regulator of cellular fate. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, 64, 1930-1944.
- [157] Jope, R. S., Johnson, G. V. W.: The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, 29, 95-102.
- [158] Malumbres, M., Barbacid, M.: Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, 30, 630-641.
- [159] Wang, S., Fischer, P. M.: Cyclin-dependent kinase 9: A key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, 29, 302-313.
- [160] Palmer, R. H., Verneris, E., Grabbe, C., Hallberg, B.: Anaplastic lymphoma kinase: Signalling in development and disease. *Biochem. J.* **2009**, 420, 345-361.
- [161] Neal, J. W., Sequist, L. V.: Exciting new targets in lung cancer therapy: ALK, IGF-1R, HDAC, and Hh. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2010**, 11, 36-44.

- [162] Ellis, L. M., Hicklin, D. J.: VEGF-targeted therapy: Mechanisms of anti-tumour activity. *Nat. Rev. Cancer*. **2008**, 8, 579-591.
- [163] Ivy, S. P., Wick, J. Y., Kaufman, B. M.: An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2009**, 6, 569-579.
- [164] Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J.* **1999**, 13, 9-22.
- [165] Lohela, M., Bry, M., Tammela, T., Alitalo, K.: VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, 21, 154-165.
- [166] Kim, S. J., Seo, J. H., Lee, Y. J., Yoon, J. H., Choi, C. W., Kim, B. S., Shin, S. W., Kim, Y. H., Kim, J. S.: Autocrine vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor-2 growth pathway represents a cyclooxygenase-2-independent target for the cyclooxygenase-2-inhibitor NS-398 in colon cancer cells. *Oncology*. **2005**, 68, 204-211.
- [167] Golubovskaya, V. M., Gross, S., Kaur, A. S., Wilson, R. I., Xu, L.-H., Yang, X. H., Cance, W. G.: Simultaneous inhibition of focal adhesion kinase and Src enhances detachment and apoptosis in colon cancer cell lines. *Mol. Canc. Res.* **2003**, 1, 755-764.
- [168] Bilbao, P. S., Santillán, G., Boland, R.: ATP stimulates the proliferation of MCF-7 cells through the PI3K/Akt signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, 499, 40-48.
- [169] González, L., Garcia-Martinez, J. M., Calcabrini, A., Agulló, M. T., Amat, C. G., Calvo, J. P., Aranda, A., Martín-Pérez, J.: Role of c-SRC in human MCF7 breast cancer cell tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **2006**, 280, 13285-13291.
- [170] Kopetz, S., Lesslie, D. P., Dallas, N. A., Park, S. I., Johnson, M., Parikh, N. U., Kim, M. P., Abbruzzese, J. L., Ellis, L. M., Chandra, J., Gallick, G. E.: Synergistic activity of the Src family kinase inhibitor dasatinib and oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. *Cancer Res.* **2009**, 69, 3842-3849.
- [171] Aesoy, R., Sanchez, B. C., Norum, J. H., Lewensohn, R., Viktorsson, K., Linderholm, B.: An autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 signaling loop confers resistance to 4-hydroxytamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **2008**, 6, 1630-1638.
- [172] Armarego, W. L. F., Chai, C. L. L.: *Purification of laboratory chemicals*. 5. Aufl., **2003**, MPG Books, Bodmin, Cornwall, USA, 6-52.
- [173] Crum, J. D., Sprague, P. W.: The synthesis of murrayanine. *Chem. Commun.* **1966**, 417-418.

- [174] Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y., Oldenburg, K. R.: A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, 4, 67-73.
- [175] Beauchard, A., Laborie, H., Rouillard, H., Lozach, O., Ferandin, Y., Le Guével, R., Guguen-Guillouzo, C., Meijer, L., Besson, T., Thiéry, V.: Synthesis and kinase inhibitory activity of novel substituted indigoids. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6257-6263.
- [176] Bettayeb, K., Sallam, H., Ferandin, Y., Popowycz, F., Fournet, G., Hassan, M., Echalié, A., Bernard, P., Endicott, J., Joseph, B., Meijer, L.: N-&-N, a new class of cell death-inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, 7, 2713-2724.
- [177] Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P. J., Blow, J. J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.-G., Moulinoux, J.-P.: Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 243, 527-536.
- [178] Primot, A., Baratte, B., Gompel, M., Borgne, A., Liabeuf, S., Romette, J.-L., Jho, E., Costantini, F., Meijer, L.: Purification of GSK-3 by affinity chromatography on immobilized axin. *Protein Expr. Purif.* **2000**, 20, 394-404.
- [179] Droucheau, E., Primot, A., Thomas, V., Mattei, D., Knockaert, M., Richardson, C., Sallicandro, P., Alano, P., Jafarshad, A., Baratte, B., Kunick, C., Parzy, D., Pearl, L., Doerig, C., Meijer, L.: *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* **2004**, 1697, 181-196.
- [180] Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R. H., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M.: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83, 757-766.
- [181] Oda, A., Okayasu, M., Kamiyama, Y., Yoshida, T., Takahashi, O., Matsuzaki, H.: Evaluation of docking accuracy and investigations of roles of parameters and each term in scoring functions for protein-ligand docking using ArgusLab software. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, 80, 1920-1925.
- [182] HyperChem 8.0.4, Hypercube, Inc., Gainesville, Florida, <http://www.hyper.com>.



## Danksagung

Für die Durchführung von Kinaseassays an isolierten Proteinkinasen möchte ich mich bei Herrn Y. Ferandin und Herrn Prof. Dr. L. Meijer der Station Biologique de Roscoff (CNRS, Frankreich) sowie Herrn Dr. J. E. Ehlert, Herrn Dr. M. H. G. Kubbutat, Herrn Dr. C. Schächtele, Herrn Dr. F. Totzke und der Firma ProQinase GmbH, Freiburg bedanken.

Den Mitarbeitern des National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA danke ich für die Durchführung der biologischen Testungen an humanen Tumorzelllinien. Mein herzlicher Dank gilt Herrn J.-Prof. Dr. I. Ott, Herrn A. Meyer, Herrn R. Rubbiani und Herrn L. Oehninger, Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, für die fachliche Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit bezüglich der Proliferationsuntersuchungen an MCF-7- und HT-29-Zellen.

Für den fachliche Rat und die Aufnahme der fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen danke ich Herrn Prof. Dr. S. Behrends, Herrn Dr. T. Haase und Frau M. Busker, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie der TU Braunschweig.

Bei Frau S. Ludewig und Herrn Dr. T. Haase bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Aufnahme der Fluoreszenzspektren.

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Dr. L. Preu, Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, für die Durchführung der Docking-Experimente aussprechen und ihm sowie Herrn Dr. H.-O. Burmeister für die wertvollen fachlichen Diskussionen bezüglich analytischer Fragestellungen danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. L. Ernst, Frau Dr. K. Ibrom und Frau P. Holba-Schulz, NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig, für die Aufnahme der NMR-Spektren sowie Herrn Dr. U. Papke, Frau D. Döring und Frau C. Mlynek, Massenspektrometrie-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig, für die Durchführung der massenspektroskopischen Untersuchungen und Herrn Prof. Dr. P. G. Jones und seinen Mitarbeitern, Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig für die Anfertigung der Röntgenkristallstruktur-Analysen.

Den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, Frau B. Babic, Frau S. Meyer und Frau P. Reich, gilt mein Dank für die Anfertigung der FT-IR-Spektren, der Elementaranalysen sowie für die Probenvorbereitung für die NMR-Experimente. Den Mitarbeitern Herrn K. Hartmann, Herrn E. Hinz, Herrn F. Roese und Herrn M. Söchtig danke ich für die Versorgung mit Chemikalien und Glasgeräten sowie ihre technische Unterstützung.

Meinen wissenschaftlichen Hilfskräften Frau C. Müller, Herrn S. Wölfel und Herrn S. Loth sei für die unterstützende Tätigkeit in meinem Labor gedankt.

Den Mitgliedern des Instituts für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig danke ich ganz herzlich für die schöne Zeit und die angenehme Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern meines Arbeitskreises Herrn Dr. H. Stukenbrock, Frau Dr. C. Reichwald, Frau Dr. A.-M. Egert-Schmidt, Frau Dr. A. Becker, Frau Dr. W. Brandt, Frau Dr. S. Schmidt, Frau J. Ryczak, Frau R. Determann, Herrn H. Falke, Frau A. Lader, Frau R. Korn, Frau F. Maiwald und Herrn S. Wölfel. Zudem möchte ich mich an dieser Stelle besonders bei Herrn Dr. M. Lorke und den Kollegen des 5. Fachsemesters Frau Dr. A.-M. Egert-Schmidt, Herrn H. Falke, Frau M. Isedor, Frau D. Kaminski, Frau S. Lucka und Frau K. Staats für die angenehme kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Sehr dankbar bin ich Herrn Dr. L. Preu, Frau A. Lader und Frau J. Ryczak für die Hilfe beim Lesen der Korrekturen.

Außerdem danke ich meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihre fortwährende Motivation.

## Lebenslauf

Name	Nadine Caroline Tolle
Geboren am	28. Juni 1982
Geburtsort	Wolfenbüttel
1994-2001	Gymnasium Große Schule, Wolfenbüttel
06/2001	Allgemeine deutsche Hochschulreife
10/2001-03/2006	Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
07/2006-12/2006	Erster Abschnitt der praktischen Ausbildung zur Apothekerin im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. T. Rades an der School of Pharmacy, University of Otago, Neuseeland
01/2007-06/2007	Zweiter Abschnitt der praktischen Ausbildung zur Apothekerin in der Wolf-Apotheke, Wolfenbüttel
09/2007	Approbation zur Apothekerin
seit 09/2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. C. Kunick
01/2011	Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik